

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPLIT-DOSE ERHOLUNG
VOM SUBLETALEN STRAHLENSCHADEN AN ZWEI
MELANOMEN DER MAUS

vorgelegt von

Georg Halder

Disbui. München

1988



Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. Riethmüller

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPLIT-DOSE ERHOLUNG
VOM SUBLETALEN STRAHLENSCHADEN AN ZWEI
MELANOMEN DER MAUS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Georg Haider
Wang

München 1987

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. K.-R. Trott

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. G. Riethmüller
Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dr. J. Kummermehr

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.1988

Herrn Prof. K.-R. Trott danke ich für die Überlassung des
Themas dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Kummermehr für die
wissenschaftliche Betreuung und die Gelegenheit zu aus-
führlicher Diskussion beim Entstehen dieser Arbeit. Ebenso
danke ich den Assistentinnen und Assistenten des Strah-
lenbiologischen Instituts und den Tierpflegern und -pfle-
gerinnen für ihre hilfreiche Unterstützung beim praktischen
Teil dieser Arbeit.

Die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung Neuherberg
hat in großzügiger Weise durch die Bereitstellung der Tiere
und des Versuchsmaterials die Ausführung der Experimente
ermöglicht.

Gewidmet meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555421_0034

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL, METHODEN UND VERSUCHSANORDNUNG	4
2.1 Tumorsysteme	4
2.2 Versuchstiere	4
2.3 Transplantation der Tumoren	5
2.4 Größenmessung der Tumoren	5
2.5 Auswahlkriterien für Versuchstumoren	6
2.6 Röntgenbestrahlung	7
2.7 Versuchsaufbau	8
2.8 Beurteilung der Behandlungswirkung	11
2.9 Lokale Tumorheilung	12
2.10 Hautreaktion	12
3. ERGEBNISSE	14
3.1 Wachstumsverhalten der unbestrahlten Tumoren	14
3.2 Wirkung von Einzeitdosen auf das Harding-Passey Melanom	15
3.3 Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das H.P.-Melanom	17
3.4 Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung	19
3.5 Wirkung von Einzeitdosen auf das B-16 Melanom	21
3.6 Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das B-16 Melanom	22
3.7 Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung	24
3.8 Dosisabhängigkeit der Heilung	26
4. DISKUSSION	31
4.1 Ziel und Grundlagen der Fraktionierung	31
4.2 Intrazelluläre Erholung und exponentielle Schulterkurve	33
4.3 Regrowth delay	34
4.4 Erholte Dosis pro Intervall	37
4.5 Quasi-Einzeldosis-Überlebenskurven	40
4.6 Linear-quadratisches Modell der Dosiswirkungskurve	41

4.7	Isoeffektkurven nach Strandqvist	48
4.8	Sichtung von experimentellen Ergebnissen verschiedener Melanome aus in vitro und in situ Assays	50
4.9	Klinik	51
5.	ZUSAMMENFASSUNG	54
6.	LITERATURVERZEICHNIS	56

1. EINLEITUNG

Das maligne Melanom ist unter den Erkrankungen der Haut die häufigste Todesursache. An allen malignen Tumoren ist es mit einem Anteil von 1-3 % beteiligt. In den USA ist es für 1 % aller Krebstoten verantwortlich (48). Ferner hat die Inzidenz der Erkrankung besonders unter der hellhäutigen Bevölkerung der westlichen Welt zugenommen (33). Während zwischen 1951-1967 sich die Mortalität noch nahezu verdoppelt hatte, ist aber inzwischen eine Mortalitätsabnahme festzustellen (33,48).

Veränderte Lebensgewohnheiten wie ausgiebiges Sonnenbaden, haben zu dieser Entwicklung beigetragen. Wenn auch bei der Entstehung des malignen Melanoms genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen, insbesondere ultraviolette Sonnenstrahlen, eine wichtige Rolle zugewiesen wird, ist letztlich die Ursache des malignen Melanoms noch unbekannt (33,59).

Die Grundlage der Behandlung des malignen Melanoms ist derzeit die chirurgische Therapie. Abhängig von der Eindringtiefe des Tumors werden 5 Schweregrade (Level I-V) unterschieden. Bei Level I und II wird großzügig lokal exzidiert, d.h. mit einem tumorfreien Sicherheitsabstand von 5-7 cm vom Tumorrand. Die Tumorexzision schließt das subkutane Fettgewebe und die darunter liegende Fascie mit ein. Ab Level III, d.h. die Eindringtiefe des Tumors reicht bis ans Stratum reticulare, wird von einigen zusätzlich Lymphbahn- und Knotendisektion empfohlen. Die Ausbreitung der Tumorzellen ist in drei Stadien eingeteilt. Mit der angegebenen chirurgischen Behandlung werden Fünfjahresüberlebensraten im Stadium I (freie Lymphknoten) von 51.3%, im Stadium II (regionale Lymphknoten befallen) von 12.6 % und im Stadium III (Fernmetastasen) von 0.7 % erzielt (30,43). Andere Behandlungsmöglichkeiten wie eine Immunotherapie in Verbindung mit Hyperther-

mie, sind über das Experimentierstadium noch nicht hinaus. Die Chemotherapie wird als ultima ratio bei Fernmetastasen eingesetzt.

Unbefriedigender Erfolg der radikalen Exzision, die Notwendigkeit der Behandlung von Rezidiven, sowie die prinzipiellen Vorteile einer nicht invasiven Behandlungsmethode speziell bei funktionellen oder kosmetischen Problemen, die sich aus einem Sitz des Primärtumors oder von Metastasen z.B. im Gesicht oder an der Fußsohle ergeben, lassen als alternative oder additive Behandlungsform auch eine Strahlentherapie als wünschenswert erscheinen (36). Die Erfolge einer kurativen Strahlentherapie werden jedoch außerordentlich kontrovers diskutiert (36).

Während das maligne Melanom zu Beginn strahlenbiologischer Untersuchungen noch für äußerst strahlenresistent gehalten wurde, läßt sich diese Ansicht nach neueren Erkenntnissen nicht mehr aufrecht erhalten (2,4,8,12,32,35,38,45,46,49,56).

Es sind drei Gründe für eine erhöhte Strahlenresistenz denkbar. Möglicherweise besitzt das Melanom eine inherente Strahlenresistenz. Überlebensraten, die aus Überlebenskurven menschlicher Melanomzellen bei 2 Gy abgeleitet wurden, zeigen eine große Streuung der Empfindlichkeiten, unterliegen aber dem Einwand, daß sie an etablierten Zelllinien bestimmt wurden (11). Unter Umständen könnte die Strahlenresistenz bei 2 Gy Ausdruck einer großen Schulterbildung der Überlebenskurve sein, die sich bei einer bemerkenswerten Reparaturfähigkeit des Melanoms ergäbe. Besitzt die Tumorzelle eine außergewöhnliche Erholungsfähigkeit nach Bestrahlung, so wird bei den derzeit üblichen Fraktionsschematas, wo pro Tag 2 Gy verabreicht werden, eine relativ geringe, biologisch effektive Tumordosis erreicht. Sofern tolerabel, versprechen damit größere Dosen pro Fraktion eine effektivere Behandlung. Besonders Overgaard erweist sich als Verfechter dieser Ansicht (36,37). Dagegen haben andere Analysen klinischer

Daten gezeigt, daß die Behandlungsergebnisse weniger von den Fraktionsgrößen als von der Gesamtbehandlungszeit abhängig sind (5,56). Als biologische Ursache dafür sind Repopulierungsvorgänge, d.h. Vermehrung überlebender Zellen während des Behandlungszeitraumes, anzusehen. In diesem Fall ließe sich die Strahlenresistenz durch Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit mindern. Eine neuere Veröffentlichung zeigt bei der Strahlentherapie des malignen Melanoms mit akzelerierter Fraktionierung positive Ergebnisse (60).

Die Meinungen über das Ausmaß des Einflusses der möglichen Ursachen auf die Strahlenresistenz sind stark gegensätzlich. Daher bleibt die Frage des optimalen strahlentherapeutischen Behandlungsschemas des malignen Melanoms offen. Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen ist die Frage, ob im Tiermodell Nagermelanome in ihrer Fähigkeit zur Erholung von subletalem Strahlenschaden. Unterschiede zu anderen transplantablen Nagertumoren aufweisen. Zu diesem Zweck wurde das Harding-Passey Melanom und das Melanom B16 untersucht.

2. MATERIAL, METHODEN UND VERSUCHSANORDNUNG

2.1 Tumorsysteme

Eines der untersuchten Tumorsysteme war das Harding-Passey Melanom. Bereits 1925 beschrieben ihn seine Entdecker Harding und Passey als Tumor, der spontan auf einer normalen, schokoladebraunen Maus entstand (20). Obwohl dieser Tumor aus einem nicht definierten Mäusestamm entstammt, läßt er sich als allogener Tumor erfahrungsgemäß auf viele Mäusestämme erfolgreich transplantieren. Dieses Melanom verhält sich wie andere transplantable Mäusetumoren. Nach Transplantation auf andere Mäuse wächst es weiter. Wird es operativ unvollständig entfernt, rezidiviert es lokal. Ferner wächst es invasiv und setzt manchmal Metastasen. Ein großer Teil der Zellen im Tumor sind Wirtszellen, d.h. Phagozyten, die mit Melanin angefüllt sind. Die hier untersuchte Tumورlinie wuchs auf weißen Albinomäusen und wurde 1971 von Dr. Gericke vom Tumorklaboratorium der Farbwerke Hoechst zur Verfügung gestellt. Seitdem wurde es auf NMRI-Mäusen, teils auch auf der C3H Maus weiterpassagiert.

Zweites Untersuchungsobjekt war das Melanom B-16. Es stammt aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) und wurde auf C57 Bl/6J Mäusen passagiert.

2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden an zwei verschiedenen Mäusestämmen durchgeführt, die beide in der Versuchstierhaltung der GSF unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gezüchtet wurden. Das Harding-Passey Melanom wurde auf ausgezüchteten, männlichen Albinomäusen vom Stamm NMRI passagiert. Das B-16 Melanom wurde auf weiblichen, ingezüchteten C57 Bl/6J Mäuse passagiert. Die Tiere wurden mit

Standardfutter (Altromin (R)) und Wasser ernährt. Zur Zeit der Tumorimplantation hatten sie ein Alter von 8-10 Wochen erreicht.

2.3 Transplantation der Tumoren

Als Spendertumoren wurden einwandfrei subkutan gewachsene Tumoren einer Größe von 200-400 mg verwendet. Nach Tötung der Maus wurde der Tumor unter sterilen Kautelen herauspräpariert und von anhängendem Binde- und Fettgewebe befreit. Mittels Rasierklinge und Pinzette wurde offensichtlich nekrotisches Gewebe entfernt, das übrige Gewebe in kleine Würfel von etwa 1 mm Kantenlänge geschnitten und in physiologische Kochsalzlösung gelegt. Je ein Würfel wurde anschließend mit einem Trokar einer Maus, die vorher mit Evipan (R) betäubt und an der Injektionsstelle 'rasiert worden war, durch einen kleinen Hautschnitt subkutan an der Axillarlinie in Höhe des Rippenbogens deponiert. Anschließend wurden die betäubten Tiere durch Stanzmarken im Ohr unverwechselbar markiert. Die Wunde heilte komplikationslos innerhalb von 4 Tagen. Bei etwa 90 % der so behandelten Tiere wurde nach ca. 1 Woche ein subkutaner, kugelig Tumor palpabel. Bei einigen Mäusen entwickelte sich im Stichkanal der Kanüle durch verschleppte Tumorzellen ein Zweittumor. Trat dieses Ereignis nach der Behandlung der Tiere auf, so wurde die Maus in Narkose operiert und der Zweittumor in toto exzidiert. Andernfalls wurde die Maus als Versuchstier verworfen.

2.4 Größenmessung der Tumoren

Das Wachstum der Tumoren wurde vom Erreichen der Palpabilität an durch externe Größenmessung verfolgt. Hierzu diente eine Plexiglasschablone, in die kreisrunde Löcher mit steigendem Durchmesser gebohrt waren. An der nicht

narkotisierten Maus wurde durch Einpassen der Tumorkontur in verschiedene Bohrungen dasjenige Bohrloch ausgewählt, das durch die Tumorkugel am besten ausgefüllt wurde. Jeder Durchmesser eines Schablonenlochs entsprach einem bestimmten Tumorgewicht. Dies war durch bereits vorliegende Kalibrierungsmessungen verifiziert worden.

2.5 Auswahlkriterien für Versuchstumoren

Die Wirkungsbeurteilung der Behandlung sollte größtenteils auf der therapieinduzierten Wachstumsstörung beruhen. Daher waren an die Wachstumsform folgende Anforderungen zu stellen:

- a) der Tumor mußte subkutan gut verschieblich sein. Um zuverlässige Messungen mit der Schablone zu ermöglichen, durfte er also weder mit der Haut noch mit der Thoraxwand verbacken sein. In die Haut infiltrierte Tumoren neigen nach Bestrahlung zu Ulzerationen, mit der Thoraxwand verwachsene Tumoren machen ein Abklemmen des Tumors zur Erzielung anoxischer Verhältnisse unmöglich.
- b) Der Tumor mußte eine einigermaßen kugelige Gestalt haben, um den Meßfehler gering zu halten.
- c) Um Tumorkollektive mit einigermaßen gleicher Wachstumsgeschwindigkeit zu erhalten, wurden für die Untersuchung nur Tumoren verwendet, die nach 15 bis 20 Tagen (H.P.-Melanom), bzw. nach 10 bis 17 Tagen (B-16 Melanom) eine Größe von 80-120 mg erreicht hatten. Langsamer oder schneller wachsende Tumoren wurden ausgeschieden.

2.6 Röntgenbestrahlung

Die Tiere wurden mit dem Materialprüfungsröntgengerät Isovolt 420 der Fa. Seifert bestrahlt. Bei einer Röhrenspannung von 300 KV, 10 mA Röhrenstrom, 0,6 mm Cu- und 1 mm Al-Filterung betrug die Dosisleistung in 20 cm Fokus-Tumor-Abstand etwa 5 Gy/min.

Die Bestrahlungsvorrichtung bestand aus einer kreisrunden Grundplatte aus PVC, die unterhalb der Strahlenquelle auf den Röhrenfokus zentriert war und sich mit einer Geschwindigkeit von 1 Umdrehung pro Minute alternierend drehte. Die Scheibe war in sechs Sektoren aufgeteilt, von denen fünf zur Aufnahme von Mäusen und einer zur Aufnahme der Ionisationskammer (M-Kammer der Fa. PTW, Freiburg) diente. Über der PVC-Scheibe befand sich eine 6 mm dicke Bleiabdeckung mit gerundeten Aussparungen von 10 x 20 mm in den Bereichen, unter denen Tumoren und Ionisationskammer zu liegen kamen. Aus dem Nutzstrahlenbündel wurden so sechs den Tumorflächen entsprechende Felder ausgeblendet.

Zur Bestrahlung wurden die Tiere narkotisiert (4 mg Hexobarbital i.p.). Anschließend wurde mit einer verschraubbaren Plastikklemme die Tumorbasis umgriffen und das Gewebe zwischen Tumor und Thoraxwand abgeklemmt. Daraus resultiert eine Unterbrechung der Blutzufuhr, die nach ca. 5 Minuten einen einheitlich anoxischen Zustand im Tumor herbeiführt. Mit Hilfe der Klemme wurden die Tiere schnell und reproduzierbar auf den entsprechenden Sektoren der Grundplatte fixiert. Bei jeder Bestrahlung wurde die Strahlendosis mitgemessen, wobei ein Simplexdosimeter (Fa. PTW, Freiburg) nach Erreichen der vorgewählten Sprungzahl eine automatische Abschaltung der Strahlenquelle bewirkte. Die Dosimetervorrichtung wurde vor jeder Bestrahlung durch ein Prüfnormale (90 Sr - 90 Y-Präparat) kalibriert. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Hautklemmen von den Mäusen abgenommen und die Blutzufuhr zu den Tumoren freigegeben.

2.7 Versuchsaufbau

Um den zu untersuchenden Dosisbereich zu bestimmen, wurden in einem Vorversuch kleine Gruppen von Mäusen (jeweils 4-7 Tiere) mit H.P.-Melanomen mit Einzeldosen (40 und 47 Gy), zwei und vier Fraktionen mit unterschiedlichen Gesamtdosen (2x20 Gy; 2x25 Gy; 2x29 Gy; 4x15 Gy; 4x17.5 Gy) bestrahlt. Bei der Untersuchung des B-16 Melanoms wurden zusätzlich Gruppen mit 30 Gy Einzeldosis und fraktionierten Gesamtdosen von 2x18 Gy und 4x10.5 Gy bestrahlt. Anhand der Reaktion der Tumoren konnte der Dosisbereich ermittelt werden, der einerseits eine meßbare Strahlenreaktion ergibt und andererseits schwerwiegende Strahlennebenwirkungen an der Haut (Hautnekrose) ausgrenzt.

Es wurden folgende Versuchsgruppen gebildet:

A: Harding-Passey Melanom

a) Passage 5

	Anzahl der Tiere	Dosis (Gy)
1. Gruppe	10	0
2. Gruppe	10	35
3. Gruppe	10	40
4. Gruppe	10	45
5. Gruppe	10	50
6. Gruppe	10	2x22
7. Gruppe	10	2x26
8. Gruppe	10	2x29
9. Gruppe	10	2x32
10. Gruppe	10	4x13
11. Gruppe	10	4x15.5
12. Gruppe	10	4x18
13. Gruppe	10	4x20
14. Gruppe	10	8x7.5
15. Gruppe	10	8x9
16. Gruppe	10	8x10.5
17. Gruppe	10	8x12

b) Passage 7

	Anzahl der Tiere	Dosis (Gy)
1. Gruppe	9	0
2. Gruppe	10	30
3. Gruppe	9	35
4. Gruppe	10	40
5. Gruppe	10	45
6. Gruppe	9	2x18
7. Gruppe	10	2x22
8. Gruppe	10	2x26
9. Gruppe	5	2x29
10. Gruppe	10	4x10.5
11. Gruppe	8	8x6
12. Gruppe	10	8x7.5
13. Gruppe	8	8x9
14. Gruppe	9	8x10.5

B: B-16 Melanom

a) Passage 5

	Anzahl der Tiere	Dosis (Gy)
1. Gruppe	10	0
2. Gruppe	9	15
3. Gruppe	10	20
4. Gruppe	9	25
5. Gruppe	9	30
6. Gruppe	8	35
7. Gruppe	10	40
8. Gruppe	9	2x15.5
9. Gruppe	9	2x19
10. Gruppe	8	2x22
11. Gruppe	9	4x9
12. Gruppe	10	4x11
13. Gruppe	9	4x13
14. Gruppe	10	8x5
15. Gruppe	10	8x6
16. Gruppe	8	8x7

b) Passage 8

	Anzahl der Tiere	Dosis (Gy)
1. Gruppe	7	20
2. Gruppe	7	25
3. Gruppe	7	30
4. Gruppe	6	35
5. Gruppe	11	40

c) Passage 11

	Anzahl der Tiere	Dosis (Gy)
1. Gruppe	8	0
2. Gruppe	18	15
3. Gruppe	18	20
4. Gruppe	18	25
5. Gruppe	10	30
6. Gruppe	10	35
7. Gruppe	10	2x9
8. Gruppe	10	2x12.5
9. Gruppe	10	2x16
10. Gruppe	10	2x19
11. Gruppe	10	2x22
12. Gruppe	10	4x6
13. Gruppe	10	4x8
14. Gruppe	10	4x10
15. Gruppe	10	4x12
16. Gruppe	10	4x14
17. Gruppe	10	10x3.2
18. Gruppe	10	10x3.9
19. Gruppe	10	10x4.6
20. Gruppe	10	* 10x5.3
21. Gruppe	10	10x6

Die fraktionierten Strahlendosen wurden in folgendem Rhythmus verabreicht: 2 Fraktionen wurden in 6-stündigem Abstand gestrahlt. Bei 4 Fraktionen betrug das Zeitintervall zwischen der 1. und 2. Fraktion 4 Stunden, zwischen 2. und 3. Fraktion 12 Stunden, zwischen 3. und 4. Frak-

tion wieder 4 Stunden. 8 Fraktionen wurden an 2 Tagen mit 4 Fraktionen in je 4-stündigem Abstand und 12-stündiger Pause über die Nacht eingestrahlt. Gruppen mit 10 Fraktionen wurden behandelt wie Gruppen mit 8 Fraktionen, zuzüglich zweier Fraktionen am dritten Behandlungstag nach 12-stündiger Pause.

2.8 Beurteilung der Behandlungswirkung

Nach der Bestrahlung wurde jeden zweiten Tag die Tumorgroße mit der Schablone gemessen und die erhaltenen Werte in Protokollblätter eingetragen. War der Tumor auf eine Größe von ca. 1000 mg angewachsen, wurde die Maus abgetötet. Trat ein Wachstumsstillstand oder Regression des Tumors ein, wurde der Tumor über sechs Monate weiter beobachtet und einmal wöchentlich gemessen.

Der Größenverlauf jedes einzelnen Tumors in den Experimenten wurde durch das Aufstellen einer individuellen Wachstumskurve dokumentiert. Dazu wurde eine Behandlungsgröße von 100 mg angenommen und die tatsächlich gemessenen Werte durch Multiplikation mit einem entsprechenden Faktor normiert. Diese normierten Gewichtswerte wurde im semilogarithmischen Maßstab graphisch als Funktion der Zeit aufgetragen. Dazu wurde das geometrische Mittel des Gewichts in der Regressions- oder Latenzphase, bzw. das geometrische Mittel der Zeit in der Rezidivwachstumsphase als Funktion der Zeit graphisch aufgetragen. Die gemittelte Zeit nach Bestrahlung, die zum Erreichen einer bestimmten Größe (400 mg) nötig war, wurde von der entsprechenden Wachstumszeit der unbestrahlten Kontrollgruppe abgezogen. Es ergibt sich dadurch die Wachstumsverzögerung (regrowth delay) zur Erreichung einer bestimmten Größe. Der "regrowth delay" wurde ebenfalls als Funktion der Gesamtdosis graphisch aufgetragen.

2.9 Lokale Tumorheilung

Die Versuche mit dem B-16 Melanom wurden auch als Heilungsexperiment ausgewertet. Dazu wurden die Tumore in der Latenzphase einmal wöchentlich, in der Rezidivphase jeden zweiten Tag mit der Schablone gemessen. Latenzphase bezeichnet dabei die Phase, in der beim Tumor nach Bestrahlung über einen gewissen Zeitraum keine Gewichtsveränderung festzustellen ist. Rezidivphase ist als erneute Gewichtszunahme definiert. Blieb bei einem Tumor über 6 Monate hinweg eine Rezidivierung aus, ging er als "Heilung" in die Berechnung ein. Die histologische Untersuchung eines nach "Heilung" verbliebenen, palpablen Tumors ergab einen sterilisierten Tumorrest eines Melanomes. Mikroskopisch war makrophagisch gespeichertes Melanin und Lymphozytenherdchen zu sehen. Dazwischen lagen kleine Herde von (vermutlich sterilisierten? morphologisch intakten?) Tumorzellen.

In einem Fall trat während der Latenzphase im bestrahlten Körperareal einer Maus ein Zweittumor auf, von dem eine Strahleninduktion anzunehmen war. Die histologische Untersuchung ergab ein Lymphom.

Aus den Heilungsdaten wurde nach der Maximum-likelihood-Methode nach Porter der Verlauf der Heilungskurve berechnet und graphisch dargestellt (40,41). Da der Fall, daß ein Tier in der Rezidivphase durch Tod ausschied oder einen strahleninduzierten Zweittumor entwickelte, nicht auftrat, erübrigte sich die Berechnung der Heilungsdaten nach dem Kaplan-Meier'schen Verfahren (58).

2.10 Hautreaktion

Nach Bestrahlung traten bei einigen Tieren dosisabhängig ab etwa dem 10. Tag die bekannten akuten Strahlenfolgen auf. Im niedrigen Dosisbereich etwa unter 40 Gy waren

dies Erythem, Haarausfall, trockene Schuppung und Depigmentation der nachwachsenden Haare. Im höheren Dosisbereich zeigte sich feuchte Hautdesquamatiuon, die nach ca. 3-4 Wochen, z.T. unter Hinterlassung einer fibrotischen Narbe, abheilten. Bei der C57/bl-Maus waren im höheren Dosisbereich anhaltende Nekrosen der Haut festzustellen, an denen Mäuse verendeten oder die unter Ausbildung von stark fibrotischen Narben spät abheilten. Dadurch wurde ein exaktes Messen des Tumorgewichts erschwert und teilweise unmöglich gemacht. Als Versuchsergebnis konnte lediglich die Festlegung des Dosisbereichs für die nachfolgenden Versuchsgruppen gewonnen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Wachstumsverhalten der unbestrahlten Tumoren

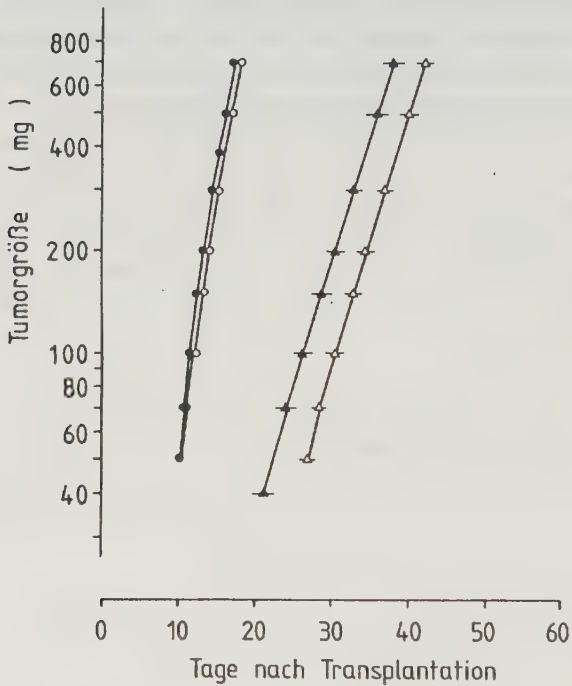


Abb.1: Gemittelte Wachstumskurven des H.P.-Melanoms und B-16 Melanoms. Jeder Punkt stellt den Mittelwert ($\pm$ SEM) aus verschiedenen Tumorpässagen dar: B-16 Passage 11 (o), B-16 Passage 5 (●), H.P. Passage 5 (▲), H.P. Passage 7 (△)

Unbehandelte Tumoren beider Melanomlinien wachsen regelmäßig und ohne Spontanregression. In ihrer Latenzzeit bis zur Palpabilität und der nachfolgend registrierten Wachstumsgeschwindigkeit zeigen sie deutliche Unterschiede.

Abbildung 1 zeigt die gemittelten Wachstumskurven von jeweils 2 Kontrollgruppen der unbestrahlten, nicht abgeklemmten Tumoren. Das B-16 Melanom wächst nach Transplantation mit einer geringeren Latenzzeit und zeigt zwischen den Passagen keine größeren Unterschiede. Die Wachstumskurve des Harding-Passey Melanoms verläuft flacher. Außerdem ist bei Passage 7 eine größere Latenzzeit nach Transplantation bis zum Einsetzen der Wachstumsphase festzustellen.

3.2 Wirkung von Einzeitdosen auf das HP-Melanom

Die Mittelwertskurven der Abbildung 2 a und b geben den Verlauf des subkurativ bestrahlten H.P.-Melanom wieder. Wie beschrieben, liegen den Kurven Mittelwertberechnungen zweier Parameter zugrunde. Das geometrische Mittel des Gewichts als Funktion der Zeit ist durch senkrechte Balken, das der Zeit in der Rezidivwachstumsphase als Funktion der Zeit durch waagrechte Balken ausgedrückt. Der Verlauf zeigt teils dosisunabhängige, teils dosisabhängige Veränderungen des Wachstums. Die Tumormasse nahm nach allen Dosen zunächst noch zu, sistierte dann nach einigen Tagen und nahm anschließend auf Werte um oder unter die Ausgangsgröße wieder ab. Mit dosisabhängiger Latenzzeit traten die Tumoren dann in das definitive Rezidivwachstum ein. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe weisen diese Kurven dosisabhängig einen flacheren Verlauf, also verminderte Wachstumsgeschwindigkeit auf. Bei vergleichbarer Wachstumsrate ist bei Passage 7 bei gleichen Dosisgruppen eine längere Latenzzeit bis zum Eintritt des Rezidivwachstums festzustellen.

Der Bestrahlungseffekt setzt sich also aus zwei dosisabhängigen Komponenten zusammen:

- zum einen aus der Latenzzeit bis zum Wiedereinsetzen des Rezidivwachstums
- zum anderen aus der Steilheit der Rezidivwachstumskurve.

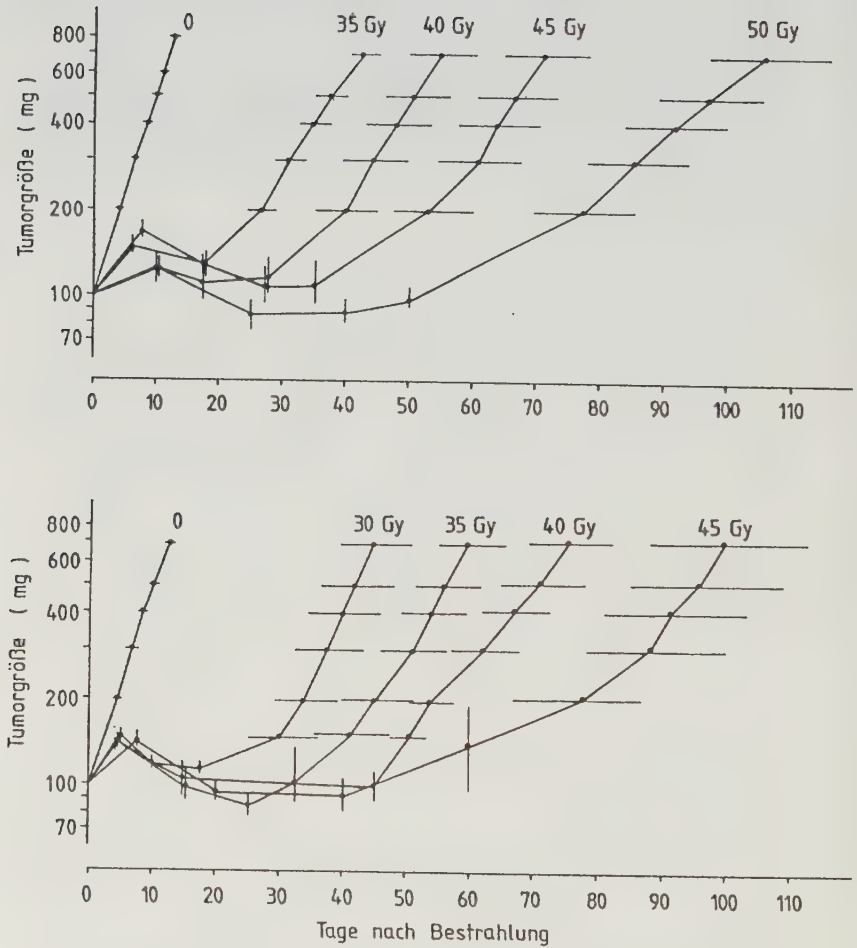


Abb.2: Gemittelte Wachstumskurven des H.P.-Melanoms nach Einzelbestrahlung der abgeklebten Tumoren mit unterschiedlichen Dosen.
a) Passage 5; b) Passage 7
Die mit 0 Gy bezeichnete Kontrollgruppe entstammt dem jeweiligen Versuch.

3.3 Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das H.P.-Melanom

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Wachstumskurven der Passagen 5 und 7 des H.P.-Melanoms für Bestrahlung mit 2, 4 oder 8 Fraktionen. Wie in 2.7. beschrieben, betrug der

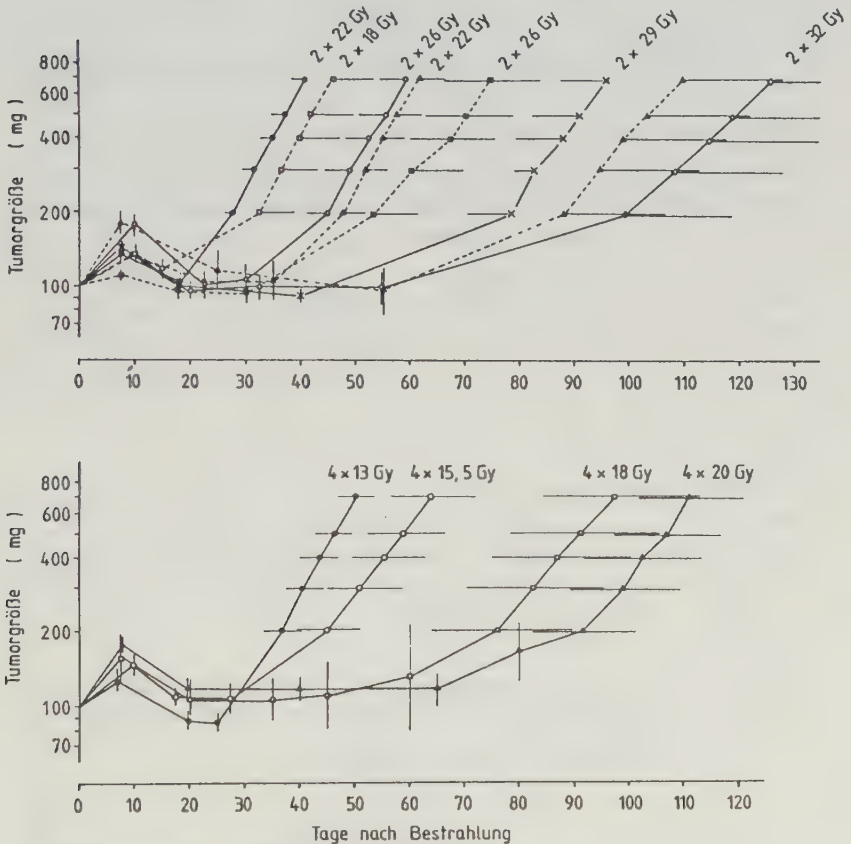


Abb.3: Gemittelte Wachstumskurven des H.P.-Melanoms nach fraktionierter Bestrahlung der abgeklemmten Tumoren:
a) Passage 5 (···) und Passage 7 (---) mit 2 Fraktionen,
b) Passage 5 mit 4 Fraktionen.

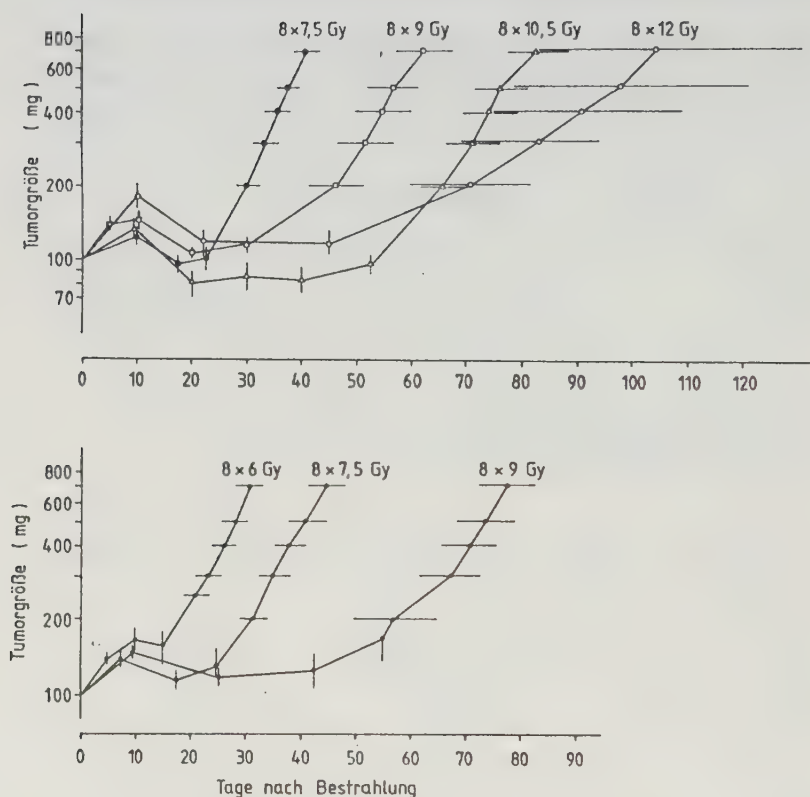


Abb.4: Gemittelte Wachstumskurven des H.P.-Melanoms nach fraktionierter Bestrahlung der abgeklemmten Tumoren:
a) Passage 5 mit 8 Fraktionen,
b) Passage 7 mit 8 Fraktionen.

zeitliche Abstand der einzelnen Fraktionen untereinander mindestens 4 Stunden. Die gemittelten Wachstumskurven steigen wiederum anfangs an, erreichen ein Plateau, um dann auf die Ausgangsgröße oder darunter abzufallen. Nach einer dosisabhängigen Latenzzeit beginnen die Rezidive zu wachsen, wobei auch hier mit zunehmender Dosis die Steilheit der Kurve und damit die Wachstumsgeschwindigkeit teilweise abnimmt. Aus dem Vergleich der Graphiken geht

deutlich hervor, daß mit zunehmender Fraktionierung zum Erzielen der gleichen Wirkung mehr Gesamtdosis notwendig wird. Auch hier ist bei gleichen Dosisgruppen bei der Passage 7 eine etwas längere Latenzzeit bis zum Einsetzen des Rezidivwachstums festzustellen. Dieser Effekt schwächt sich allerdings in den Gruppen mit 8 Fraktionen ab.

3.4 Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung

Gemäß dem von Thomlinson und Craddock (52) aufgestellten Konzept wurde zur weiteren Darstellung der Strahlenwirkung auf Tumoren die Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung ermittelt. Dieses Konzept beruht auf der Beobachtung, daß die von einem Tumor für eine vorgegebene Wachstumsleistung benötigte Zeit (hier: Erreichen von 400 mg Tumorgewicht nach Bestrahlung) streng mit der applizierten Dosis korreliert.

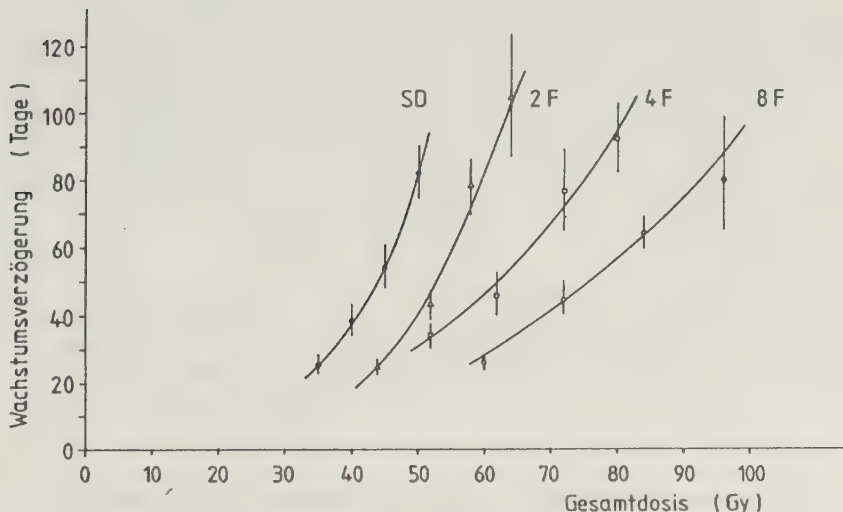


Abb.5a: Gemittelte Wachstumsverzögerungskurven der Passage 5 des H.P.-Melanoms für Einzeldosen, 2, 4 und 8 Fraktionen.

Die nach Bestrahlung zusätzlich benötigte Zeit eines Tumors zum Erreichen der vierfachen Ausgangsgröße, die als Wachstumsverzögerung definiert ist, wurde als Funktion der Gesamtdosis graphisch aufgetragen. Die Abbildungen 5 a und b zeigen die Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung für die Passagen 5 und 7 des H.P.-Melanoms. Die Gesamtdosis zur Erzielung einer definierten Wachstumsverzögerung nimmt mit steigender Zahl von Fraktionen zu. Der Fraktionierungseffekt drückt sich als Auffächerung der Dosiswirkungskurve aus. Bei einem gegebenen Level (z.B. Wachstumsverzögerung von 50 Tagen) wird mit jeder Verdopplung der Fraktionszahl ein annähernd gleiches Dosisinkrement notwendig, so daß die pro Fraktion erholte Dosis offensichtlich abnimmt.

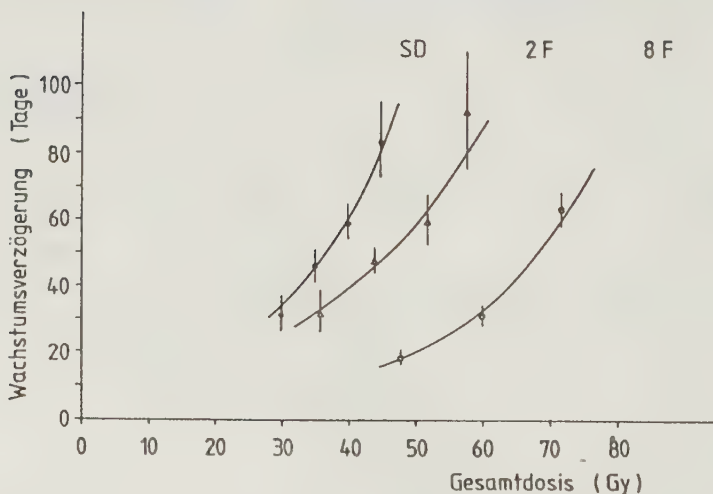


Abb.5b: Gemittelte Wachstumsverzögerungskurven der Passage 7 des H.P.-Melanoms für Einzeldosen, 2 und 8 Fraktionen.

3.5 Wirkung von Einzeildosen auf das B-16 Melanom

Ebenso wie das H.P.-Melanom wurde das B-16 Melanom durch Abklemmen der Tumoren in einen anoxischen Zustand versetzt und mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt. In einem Vorversuch waren die zu untersuchenden Dosisbereiche ermittelt worden. Dabei zeigte sich, daß die C57 Bl/6J Maus auf Bestrahlung der Haut mit Gesamtdosen von mehr als 50 Gy mit erheblichen Nekrosen reagierte. Dies erschwerte die Messung des Volumenverhaltens des Tumors mittels Schablone erheblich, bzw. machte es unmöglich.

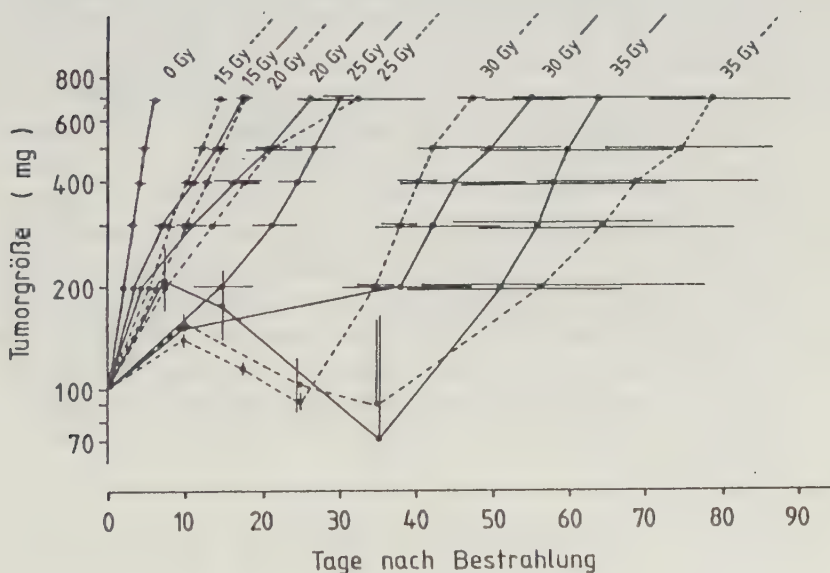


Abb.6: Gemittelte Wachstumskurven des B-16 Melanoms nach Einzeitbestrahlung der abgeklemmten Tumoren mit unterschiedlichen Dosen. Passage 5 (···); Passage 11 (—). Die mit 0 Gy bezeichnete Kurve stellt die Kontrollgruppe dar.

Das B-16 Melanom reagiert in seinem Volumenverhalten auf Bestrahlung mit Einzeitdosen unter anoxischen Bedingungen nicht grundlegend anders als das H.P.-Melanom. Eine Plateaubildung der Wachstumskurven sowie eine Abnahme des Tumorgewichtes nach Bestrahlung wurde in dem gewählten Dosisbereich allerdings erst nach relativ hohen Dosen erreicht. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe ist die Wachstumsgeschwindigkeit dosisabhängig deutlich vermindert, doch ist die Dosisabhängigkeit nicht stringent.

3.6 Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das B-16 Melanom

Tumoren des Melanoms B-16 wurden mit verschiedenen Dosen, die in 2, 4, 8 oder 10 Fraktionen appliziert wurden, bestrahlt. Die gemittelten Wachstumskurven der Passagen 5 und 11 in Abbildung 7 und 8 graphisch aufgetragen. Nach niedrigeren Gesamtdosen wachsen die Tumore mit verminderter Geschwindigkeit weiter. Bei höheren Gesamtdosen wird wie beim H.P.-Melanom ein Abfall der Tumorgroße bis unter die Behandlungsgröße und nach einer bestimmten Latenzzeit ein langsames Rezidivwachstum beobachtet. Zum Erreichen einer gegebenen Wachstumsverzögerung ist bei höherer Anzahl von Fraktionen eine insgesamt größere Gesamtdosis nötig.

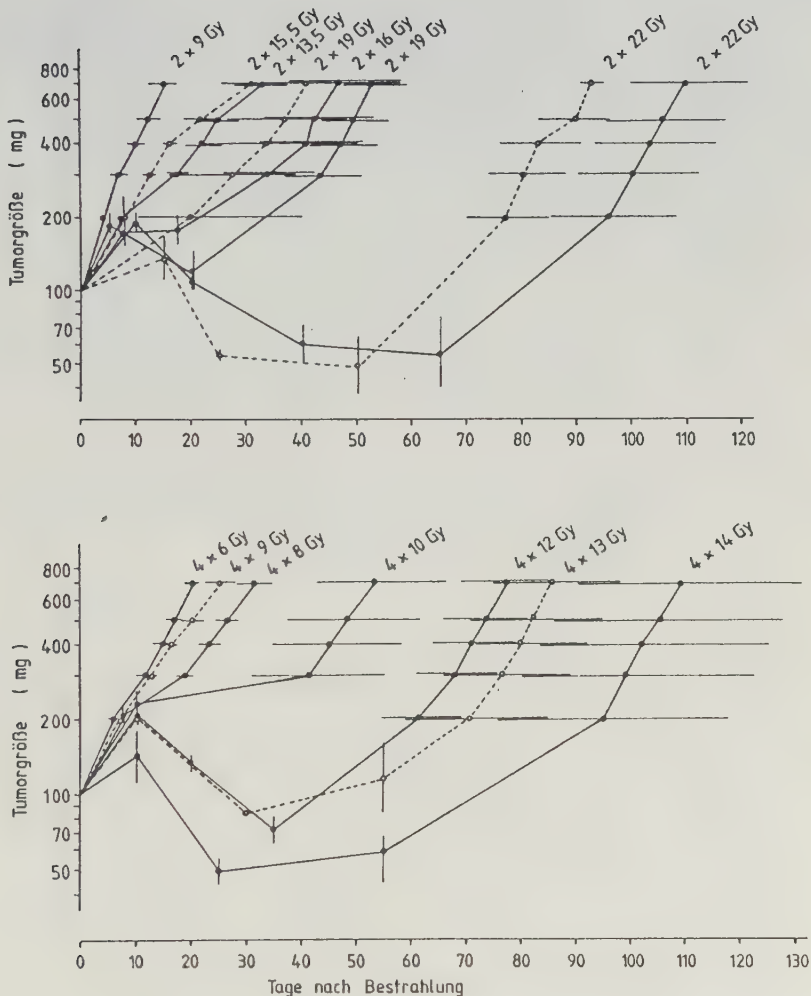


Abb.7: Gemittelte Wachstumskurven des B-16 Melanoms nach fraktionierter Bestrahlung der abgeklemmten Tumoren:
a) Passage 5 (···) und Passage 11 (—) mit 2 Fraktionen,
b) Passage 5 (···) und Passage 11 (—) mit 4 Fraktionen.

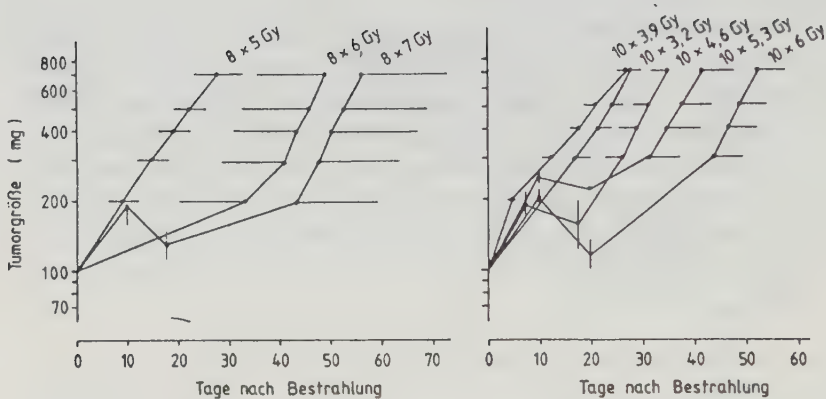


Abb.8: Gemittelte Wachstumskurven des B-16 Melanoms nach fraktionierter Bestrahlung der abgeklemmten Tumoren:
a) Passage 5 mit 8 Fraktionen,
b) Passage 11 mit 10 Fraktionen.

3.7 Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung

In Abbildung 9 a und b wurde für die Passagen 5 und 11 des Melanoms B-16 die Zeit des Tumors zum Erreichen des vierfachen Ausgangsgewichts als Funktion der Gesamtdosis graphisch aufgetragen. Die Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung zeigen, daß mit steigender Zahl von Fraktionen zum Erreichen einer definierten Wachstumsverzögerung eine höhere Gesamtdosis nötig wird. Ebenso wird bei höherer Anzahl von Fraktionen im Vergleich zu geringerer Anzahl von Fraktionen verhältnismäßig mehr Gesamtdosis erforderlich, um eine bestimmte Wachstumsverzögerung zu erzielen. Auch hier fächern sich die Kurven der Wachstumsverzögerung wieder auf, das Dosisinkrement wird pro zusätzlicher Fraktion mit steigender Zahl von Fraktionen kleiner.

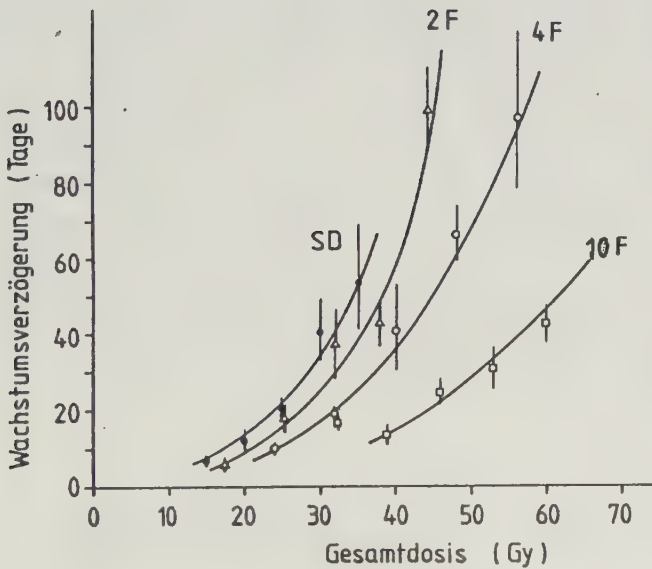
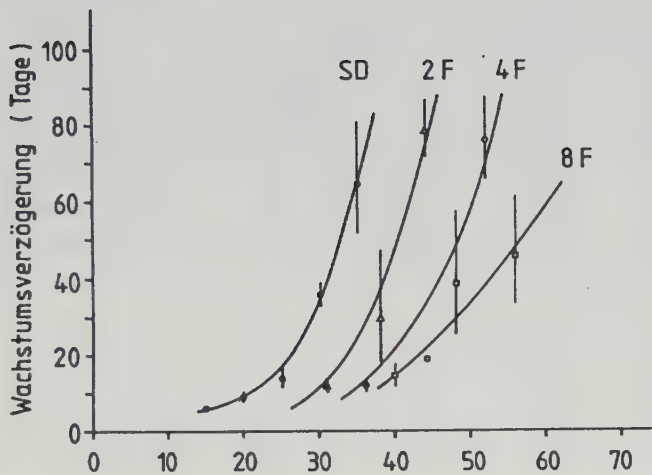


Abb.9: Dosiseffektcurven der Wachstumsverzögerung
a): Passage 5 des B-16 Melanoms für Einzeldosen, 2, 4 und 8 Fraktionen,
b): Passage 11 des B-16 Melanoms für Einzeldosen, 2, 4 und 10 Fraktionen.

3.8 Dosisabhängigkeit der Heilung

In den einzelnen Bestrahlungsgruppen des B-16 Melanoms zeichnete sich ab, daß mit steigender Gesamtdosis ein zunehmender Anteil der Tumoren überhaupt nicht mehr rezidiert. Um dies zu verifizieren, wurde die Beobachtungszeit für diese Tumoren auf 6 Monate erweitert. Hierbei ergab sich, daß die Entscheidung, ob ein Tumor endgültig geheilt ist oder nicht, bereits relativ früh getroffen werden kann. So zeigt Tabelle I, daß sich die Heilungsrate sowohl nach Einzeital als auch nach fraktionierter Bestrahlung im 5. Monat stabilisiert hat. Die Rezidivfreiheit über 6 Monate hinweg rechtfertigt es damit, einen Tumor als geheilt zu bezeichnen.

Tiere, die an Bestrahlungsfolgen verendeten, bevor die ersten Rezidive in der Gruppe auftraten, wurden von der Berechnung ausgeschieden. Dies war bei insgesamt 7 Tieren in 3 Gruppen, die in Tabelle I mit (*) bezeichnet wurden, der Fall. 10 Tiere in 6 Gruppen starben in der späten Beobachtungsphase, nachdem in ihrer jeweiligen Gruppe die Rezidivierungsphase bereits abgeschlossen war. Sie wurden in Tabelle I mit (+) gekennzeichnet. Diese Tiere wurden als "Heilungen" gewertet und in den Berechnungen entsprechend berücksichtigt. Der Fall, daß Tiere während des für die Rezidivierung kritischen Zeitraums starben oder einen strahleninduzierten Zweitumor entwickelten, trat nicht auf.

Gesamtdosis (Gy)	lokale Rezidivfreiheit (Beobachtungszeit in Monaten)			
Einzeildosen	III	IV	V	VI
15	3/27	3/27	3/27	3/27
20	8/35	6/35	6/35	6/35
25	17/34	14/34	14/34	14/34
30	13/26	13/26	12/26	12/26
35	19/24(+)	19/24(+)	19/24(+)	19/24
40(*)	16/17	16/17	16/17(+)	16/17

2 Fraktionen

18	0/10	0/10	0/10	0/10
25	4/10	4/10	4/10	4/10
31	0/9	0/9	0/9	0/9
32	5/10	4/10	2/10	2/10
36	1/4	1/4	1/4	1/4
38	11/19	11/19 (+)	11/19	11/19
44	16/18	13/18	12/18	12/18
50	3/4	3/4	3/4	3/4
56	4/4	4/4	4/4	4/4

4 Fraktionen

24	0/10	0/10	0/10	0/10
32	2/10	2/10	2/10	2/10
36	3/9	3/9	3/9	3/9
40 (*)	3/9	3/9	3/9	3/9
42	1/4	1/4	1/4	1/4
44	9/10	9/10	9/10	9/10
48	6/10	6/10	6/10	6/10
52	8/9	7/9	7/9	7/9
56	9/10	8/10	7/10 (+)	7/10
60	4/4	3/4	3/4	3/4
70	4/4	4/4	4/4	4/4

8 Fraktionen

40	4/10	3/10	3/10	3/10
48 (*)	3/8	3/8	3/8	3/8
56	6/8	5/8	5/8	5/8

10 Fraktionen

32	3/10	0/10	0/10	0/10
39	2/10	1/10	1/10	1/10
46	2/10	1/10	1/10	1/10
53	2/10	2/10	2/10	2/10
60	5/10	5/10	5/10 (+)	5/10

Tab.1: Zeitliche Abhängigkeit der lokalen Heilungsrate beim Melanom B-16. Die Zahl im Zähler gibt die Anzahl der rezidivfreien, die im Nenner die Anzahl der eingesetzten Tiere an. Gruppen, in denen Tiere vor der Rezidivierungsphase starben, sind mit (*) gekennzeichnet, das Auftreten von Todesfällen mit (+).

Gesamtdosis

(Gy)

lokale Rezidivfreiheit

(Beobachtungszeit in Monaten)

Einzeildosen	III	IV	V	VI
15	11 %	11 %	11 %	11 %
20	23 %	17 %	17 %	17 %
25	50 %	41 %	41 %	41 %
30	50 %	50 %	46 %	46 %
35	79 %	79 %	79 %	79 %
40	94 %	94 %	94 %	94 %

2 Fraktionen

18	0 %	0 %	0 %	0 %
25	40 %	40 %	40 %	40 %
31	0 %	0 %	0 %	0 %
32	50 %	40 %	20 %	20 %
36	25 %	25 %	25 %	25 %
38	58 %	58 %	58 %	58 %
44	89 %	72 %	67 %	67 %
50	75 %	75 %	75 %	75 %
55	100 %	100 %	100 %	100 %

4 Fraktionen

24	0 %	0 %	0 %	0 %
32	20 %	20 %	20 %	20 %
36	33 %	33 %	33 %	33 %
40	33 %	33 %	33 %	33 %
42	25 %	25 %	25 %	25 %
44	90 %	90 %	90 %	90 %
48	60 %	60 %	60 %	60 %
52	89 %	78 %	78 %	78 %
56	90 %	80 %	70 %	70 %
60	100 %	75 %	75 %	75 %
70	100 %	100 %	100 %	100 %

8 Fraktionen

40	40 %	30 %	30 %	30 %
48	38 %	38 %	38 %	38 %
56	75 %	63 %	63 %	63 %

10 Fraktionen

32	30 %	0 %	0 %	0 %
39	20 %	10 %	10 %	10 %
46	20 %	10 %	10 %	10 %

53	20 %	0 %	0 %	0 %
60	50 %	50 %	50 %	50 %

Tab.2: Zeitliche Abhängigkeit der lokalen Heilungsrate für die verschiedenen Dosen und Fraktionierungsschemata in prozentualer Darstellung.

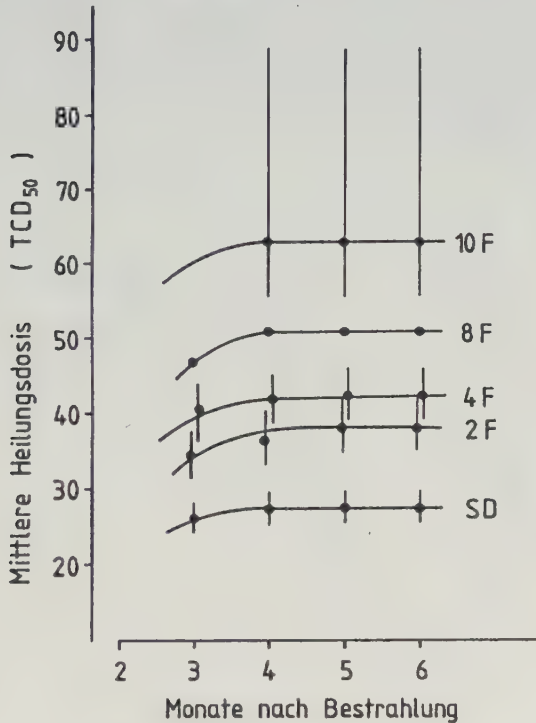


Abb.10: Mittlere Heilungsdosis (TCD 50) als Funktion der Beobachtungszeit nach Bestrahlung.

Nach der in 2.9 angegebenen Methode wurde aus den einzelnen Monatswerten die 50 % - Heilungsdosis ("tumor-control-dose" = TCD 50) berechnet und in Abbildung 10 dargestellt.

Aus Abbildung 10 ist zu erkennen, daß sich die mittlere Heilungsdosis und die Heilungsrate im 5. Monat nach Bestrahlung weitgehend stabilisiert hat. So wurde mit dem in 2.9 erwähnten Probit-Programm die Dosisabhängigkeit der lokalen Heilungsrate für Einzeitdosen, 2, 4, 8 und 10 Fraktionen berechnet und in Abbildung 11 graphisch dargestellt. Mit steigender Zahl von Fraktionen ist also mehr Gesamtdosis zur Erzielung einer definierten Heilungsquote nötig.

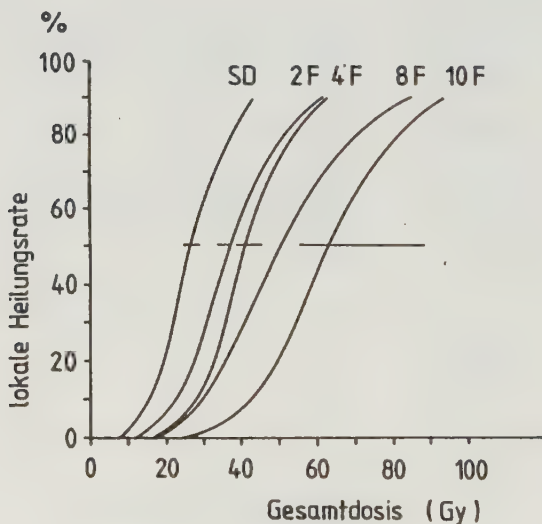


Abb.11: Dosisabhängigkeit der lokalen Heilungsrate des B-16 Melanoms nach Bestrahlung mit Einzeitdosen, sowie 2, 4, 8 und 10 Fraktionen.

4. DISKUSSION

4.1 Ziel und Grundlagen der Fraktionierung

Der Therapie von bösartigen Tumoren mittels ionisierender Strahlung liegt ein grundsätzliches Ziel zu Grunde, nämlich die Tumoreradikation bei größtmöglicher Schonung des Normalgewebes. Bereits frühe klinische Erfahrungen ergaben, daß dies mit Einzeldosen praktisch kaum je erreicht wird. Die aufgetretenen Nebenwirkungen bestanden zunächst in schwersten Hautschäden.

Ein klassisches Beispiel, wie schon frühzeitig durch Fraktionierung, also Aufteilung der Strahlendosis, versucht wurde, die therapeutische Breite zu verbessern, stellen die Tierexperimente des französischen Radiotherapeuten, Claude Regaud dar (42). Seine Experimente gründeten auf der Beobachtung, daß die schnelle und unbegrenzte Proliferationsfähigkeit von Gonadenzellen des Hodens stark den essentiellen Merkmalen der Zellproliferation in Tumorgeweben gleicht, vor allem was die morphologischen Änderungen nach Bestrahlung betrifft. Er gebrauchte die histologisch gesicherte Sterilisation von männlichen Kaninchen als Kriterium für die beste Art, einen Tumor zu sterilisieren. Er beobachtete, daß es nicht möglich war, ein Männchen mit einer einzelnen Strahlendosis zu sterilisieren, ohne dabei ernsthafte Schäden, wie z.B. tiefe Strahlennekrosen an der Skrotalhaut zu verursachen. Wurde aber die Bestrahlungsdosis in fünf gleich große Fraktionen aufgeteilt und diese über einen Zeitraum von 4-16 Tagen gegeben, war zur Erreichung einer kompletten Sterilisation zwar eine Erhöhung der Gesamtdosis um 10 % nötig, die Hautreaktion beschränkte sich jedoch auf eine trockene Radiodermatitis. Er folgerte daraus, daß Fraktionierung den Effekt einer Strahlendosis an Hoden weniger minderte als den Schaden am Skrotum. Auf diesem Weg war es möglich, den Hoden mit einer höheren effektiven

Dosis zu bestrahlen, ohne dabei Komplikationen zu riskieren. Regaud nahm an, daß die besseren Ergebnisse nach fraktionierter Bestrahlung mit der schnellen Proliferation der Tumorzellen mit unterschiedlichen Phasen relativer Strahlenresistenz und Strahlenempfindlichkeit zu tun habe.

Die Strahlenbiologie interpretiert die Ergebnisse heute anders. Trotzdem markieren die Versuche von Regaud einen wichtigen Punkt in der Evolution von Fraktionierungsprotokollen, die schließlich - nach keineswegs stetiger Entwicklung - in heute weitgehend festgelegte Fraktionierungsschemata mündet.

Ein Konzept, das die verschiedenen Vorgänge beschreibt, die während der Fraktionierungsintervalle ablaufen und die zelluläre Strahlenempfindlichkeit verändern, wurde 1975 von Withers vorgelegt und ist im wesentlichen heute noch gültig. Er faßte die experimentellen Erkenntnisse über die biologischen Grundlagen bei fraktionierter Bestrahlung zusammen und beschrieb sie als die "vier R's" der fraktionierten Strahlentherapie (63). Das bedeutet die Erholung von subletalem Strahlenschaden (repair of sublethal damage), die Redistribution der Zellen im Zellzyklus (redistribution), Repopulierung oder Vermehrung überlebender Zellen (repopulation) und Reoxygenierung (reoxygenation).

Die strahlenbiologische Forschung sieht auch heute eine wesentliche Aufgabe darin, die quantitative Bedeutung dieser Faktoren für einzelne Gewebe und Tumoren herauszuarbeiten. Im folgenden soll dies für die Erholung vom subletalen Schaden im Melanommodell geschehen, da postuliert wird, daß dieser Tumortyp in seinem Fraktionierungsverhalten möglicherweise von anderen Tumoren abweicht.

4.2 Intrazelluläre Erholung und exponentielle Schulterkurve

Ist eine Zellpopulation einer geringen Strahlendosis ausgesetzt, kann die damit verbundene Energiedeposition zu den nachstehenden Folgen führen (19):

- a) eine Ionisation (Treffer) trat im kritischen Zielgebiet nicht ein; die Zelle ist deshalb unbeschädigt.
- b) Ein Treffer hat in allen kritischen Zielgebieten der Zelle stattgefunden; in diesem Fall ist die Zelle getötet in dem Sinne, daß sie unfähig ist, sich unbegrenzt zu teilen und eine Kolonie zu bilden.
- c) Die Zelle hat nur in einigen ihrer kritischen Zielgebiete einen Treffer erhalten. Hier spricht man von subletalem Schaden, den die Zelle erlitten hat. Sie ist geschädigt, aber nicht getötet. Die Zelle ist aufgrund ihrer biologischen Reparaturmechanismen in der Lage, in einer gewissen Zeit den Strahleneffekt zu reparieren und sich vom Schaden vollständig zu erholen. Auf eine erneute Strahlendosis reagiert sie wieder wie eine noch unbestrahlte Zelle.

Bei einer Bestrahlung mit dicht ionisierenden Strahlen (z.B. Alphateilchen oder Neutronen) gilt aufgrund der Energiedeposition in einem Zellvolumen ein "Alles- oder nichts- Prinzip". Ereignisse der Kategorie c) kommen zwar vor, sind aber quantitativ vernachlässigbar.

Der Strahleneffekt wird entsprechend der "Treffertheorie" durch eine exponentielle Dosiswirkungskurve beschrieben. Das Einwirken von locker ionisierender Strahlen (Röntgen-, Gamma-, Elektronenstrahlen) auf Säugerzellen ergibt für das Kriterium des zellulären Überlebens meist Dosiswirkungskurven, die mit endlicher Neigung beginnen, dann steiler werden und im höheren Dosisbereich einem exponentiellen Verlauf zustreben. Die Treffertheorie er-

klärt diese "Schulterbildung" der Dosiseffektkurve damit, daß im niedrigen Dosisbereich die kritische Zahl von Treffern, um den Effekt auszulösen, erst zunehmend erreicht wird. Der exponentielle Teil beschreibt dann die Inaktivierung von Zellen, die alle kritischen Treffer bis auf einen erhalten haben. Die Schulterbildung ist also Ausdruck der Kumulation subletaler Strahlenschäden (26). Wird eine Gesamtdosis in mehrere Fraktionen aufgeteilt, werden verstärkt Ereignisse der Kategorie c) verursacht und die Erholung vom subletalen Strahlenschaden wird darstellbar.

4.3 Regrowth delay

Die funktionellen Methoden, mit denen die Strahlenwirkung auf den Tumor experimentell untersuchbar ist, lassen sich grob zwei Gruppen zuordnen (6): zum einen die Untersuchung der Tumorreaktion in situ, zum anderen die Untersuchung der Fähigkeit von Tumorzellen, Kolonien zu bilden. Verwendet werden darüberhinaus auch Endpunkte, die mit dem Überleben von Stammzellen nur mangelhaft verknüpft sind, so die Überlebenszeit der Wirtstiere oder der Retentionsverlust von inkorporierter Radioaktivität. Zur erstgenannten Gruppe gehört als letztlich klonogener in situ Assay die lokale Tumorheilung. Sie quantifiziert die Dosisabhängigkeit der lokalen Rezidivfreiheit eines Tumors nach Bestrahlung. Eng mit der Zahl überlebender Stammzellen korreliert auch der "regrowth delay" als der wohl am meisten gebrauchte Assay in situ. Er wurde 1967 von Thomlinson entwickelt (52). Sein Konzept beruht auf der Beobachtung, daß ein Tumor nach Bestrahlung mehr Zeit benötigt, eine definierte Wachstumsleistung (Vervielfachung der Behandlungsgröße) zu erbringen als ohne Bestrahlung. Dabei korreliert dieses Mehr an Zeit mit der Dosis, die der Tumor erhalten hat. Die zunehmende Latenzzeit wird letztlich als Funktion überlebender Stammzellen

gesehen, von denen das effektive Rezidivwachstum ausgeht. Thomlinson definiert diese Latenzverlängerung als Wachstumsverzögerung (regrowth delay).

Von den in vitro Ansätzen stellt die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit nach Aussaat von Tumorzellen die am meisten angewandte Methode dar, das Verhalten von Tumoren nach Bestrahlung zu studieren. Sie bietet die Möglichkeit, exakte quantitative Ergebnisse der zellulären Überlebensfraktion nach Bestrahlung zu bekommen. Ein Vergleich der in vitro und in vivo Assays zeigt ihre Vor- und Nachteile auf (6). So liefert die in vitro Untersuchung schnell und ökonomisch Ergebnisse, die außerdem die zelluläre Wirkung unmittelbar beschreiben. Andererseits können Artefakte das Ergebnis beeinflussen, wie z.B. mangelhafte Reparatur vom potentiell letalen Schaden, mechanischer oder enzymatischer Schaden bei der Präparation, "Rescue" von Zellen, die in situ aufgrund von Sauerstoffmangel o.ä. nachfolgend zugrunde gegangen wären, die selektive Anreicherung von Subpopulationen von Zellen und vieles andere. Nachteile der in situ Assays bestehen darin, daß sie Ergebnisse relativ langsam liefern, daß sie aufgrund der Versuchstiere, der dazugehörenden Manpower und Logistik aufwendig und teuer sind, und daß sie nur indirekt Schlüsse auf die zelluläre Wirkung zulassen. Vorteile der in situ Assays sind aber, daß sie Artefakte aufgrund von Manipulationen am Tumor vermeiden und daß sie für die meisten Experimentaltumoren anwendbar sind. Vor allem aber ist die klinische Relevanz von Vorteil, weil die in situ Technik eindeutig am naheliegendsten darstellt, was klinisch sich ereignen wird (6).

Der "regrowth delay" wird oft verwendet, obwohl das Wachstumsverhalten eines Tumors auf den ersten Blick komplex erscheint. Die nach Bestrahlung verbliebene Tumormasse setzt sich aus vorwiegend inaktivierten Tumor- und Stromazellen zusammen, die von Tumor zu Tumor sehr unterschiedlich abgeräumt werden. Diese gewebliche Tumor-

reaktion beeinflußt das Aussehen der Wachstumskurven nach Behandlung. Auch in der Phase des Rezidivwachstums können Störfaktoren als Fehlerquellen miteingehen. So können Schädigungen des den Tumor versorgenden Stromas, meist vaskulärer Art, zu einer reduzierten Wachstumsrate im Vergleich zu einem unbehandelten Tumor führen. Dieses Phänomen ist als "Tumorbetteffekt" in die Strahlenbiologie eingegangen (21).

Beim Harding-Passey Melanom ist in Abb. 3 und 4 nach einer anfänglichen Zunahme ein deutliches Abfallen des Tumolvolumens, zum Teil bis unter die Behandlungsgröße, zu erkennen. Erst nachdem das Restvolumen der verbliebenen Stammzellen die Abräumgeschwindigkeit übertroffen hat, ist das Rezidivwachstum sichtbar. Wie aus Abb. 6, 7 und 8 ersichtlich, wird beim B-16 Melanom zumindest im niedrigen Dosisbereich die Wachstumsrate der Rezidive nicht von der Abräumgeschwindigkeit übertroffen.

Die Größe Wachstumsverzögerung ist abhängig von der Zahl der im Tumor überlebenden Stammzellen (52). Dies heißt vor allem auch, daß ein gegebener Delay einer konstanten Zahl von überlebenden Stammzellen entspricht, gleichgültig wie groß die Anzahl der Fraktionen war. Durch den Vergleich isoeffektiver Dosen (Behandlung mit gleichem Delay) ist also zelluläre Erholung erfaßbar.

Um den Einfluß der dargelegten Störgrößen gering zu halten, ist zur Berechnung der Wachstumsverzögerung eine geeignete Wahl des Endpoints der Latenzzeit zu treffen (3). In dieser Arbeit wurde als Endpoint der Latenzzeit das Erreichen des Tumorrezidivs von 400 mg gewählt. Dieser Endpoint erschien weder von einem relativ großen Residualvolumen des primär behandelten Tumors, noch von möglichen dosisabhängigen Wachstumsstörungen beeinflußt.

4.4 Erholte Dosis pro Intervall

Werden einzelne Fraktionen in ausreichendem zeitlichem Abstand voneinander eingestrahlt, haben die überlebenden Zellen die Möglichkeit, durch intrazelluläre Reparaturvorgänge den subletalen Strahlenschaden zu beseitigen. Dies drückt sich in Restitution der Schulter und einem entsprechenden Mehrverbrauch an Dosis aus, um eine bestimmte Inaktivierungsrate zu erzielen. Auf der Ebene der Wachstumsverzögerung fächern sich die Kurven für den regrowth delay, wie in Abb.5 und Abb.9 dargestellt, mit zunehmender Anzahl von Fraktionen auf. Aus dem Dosisinkrement kann die erholte Dosis pro Intervall, definiert als $D_n - D_1/n - 1$, für ein beliebiges Niveau der Wachstumsverzögerung abgelesen werden.

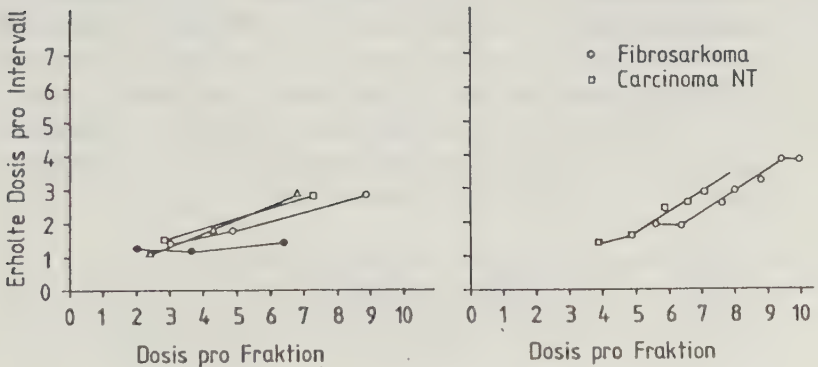


Abb.12: Darstellung der erholten Dosis als Funktion der Dosis pro Fraktion. Die Abbildung zeigt die eigenen Daten für Passage 5 (o) und Passage 7 (□) des H.P.-Melanoms und Passage 5 (▲) und Passage 11 (●) des B-16 Melanoms. (Als Isoeffekt liegt eine Wachstumsverzögerung von 40 Tagen zugrunde). Zum Vergleich wurden Daten aus der Literatur für ein transplantables Fibrosarkom und das Carcinoma NT gegenübergestellt (7).

Diese erhaltenen Dosen sind als Funktion der Dosis pro Fraktion in Abb. 12 a für die einzelnen Passagen der Melanome B-16 und H.P. aufgetragen. Mit zunehmender gegebener Dosis pro Fraktion wächst auch die erholte Dosis pro Fraktion an. Eine Ausnahme stellt die Passage 11 des Melanoms B-16 dar, die im Bereich kleiner Dosen pro Fraktion kein entsprechendes Anwachsen der erhaltenen Dosis zeigt.

Da die Melanome vor Bestrahlung durch Abklemmen einheitlich in einen hypoxischen Zustand versetzt wurden, wurden die gewonnenen Ergebnisse durch einen - konventionell mit 2,7 angenommenen - Sauerstoffverstärkungsfaktor korrigiert (7). Für den Vergleich mit anderen Tumoren wurden in der Literatur beschriebene Kurven, die mit der gleichen Methodik gewonnen worden waren, in der Abbildung 12b gegenübergestellt (7). Für alle dargestellten Tumoren ist sichtbar, daß die erholte Dosis mit steigender Dosis pro Fraktion zunimmt. Bei exponentiellem Verlauf der zellulären Überlebenskurve sollte im höheren Dosisbereich die Erholungsfähigkeit einer Sättigung zustreben. In dem dargestellten Dosisbereich kommt dies aber für das Melanom B-16 und H.P. nicht zum Ausdruck.

Wie sich zeigen läßt (7), kommt der Verlauf der zellulären Überlebenskurve auch in der Darstellung zum Ausdruck, die in Abbildung 12 benutzt wird. Bei einem initial horizontalen Beginn würde die Kurve der erhaltenen Dosis pro Fraktion als Funktion der Dosis pro Fraktion mit der konstanten Steigung 1 beginnen. Bei einer endlichen initialen Neigung der Schulterkurve als Ausdruck irreparablen Schadens würde die Linie zunehmend flacher beginnen. Daher läßt die Abweichung der Erholungskurve aus den gewonnenen Daten von einer Steigung 1 Rückschlüsse auf die anfängliche Neigung der Überlebenskurve zu.

Abbildung 12 zeigt eine deutliche Abweichung der Erholungskurve für die Melanome H.P. und B-16 von einer ge-

dachten Steigung 1. Dies läßt auf eine nicht besonders ausgeprägte Schulterbildung der Überlebenskurve schließen. Die Neigung der Überlebenskurve und damit die Erholungsfähigkeit des Melanoms ist der des Fibrosarkomas und des Carcinoma NT vergleichbar.

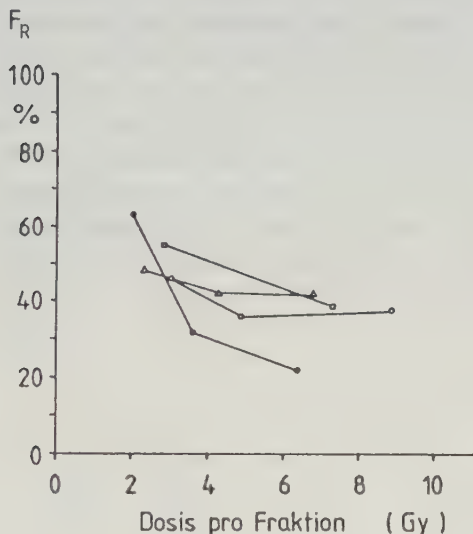


Abb.13: Darstellung der prozentual erhaltenen Dosis (FR) als Funktion der Dosis pro Fraktion. Die Abbildung zeigt die Daten für Passage 5 (o) und Passage 7 (□) des H.P.-Melanom, sowie Passage 5 (Δ) und Passage 11 (●) des B-16 Melanom.

In Abbildung 13 wurden die Erholungsdaten des Melanoms H.P. und B-16 als "fractional recovered dose" (=FR) dargestellt. FR entspricht demjenigen Prozentsatz der gegebenen Dosis, der pro Fraktion erholt wird. Er wurde als Funktion der Dosis pro Fraktion aufgetragen. Wie auch in anderen untersuchten Tumoren (7), nimmt diese mit zunehmender Dosis pro Fraktion ab.

4.5. Quasi-Einzeldosis-Überlebenskurve

Den effektiven Verlauf einer zugrundeliegenden Dosis-effektkurve zu beschreiben, wird durch die Rekonstruktion einer Quasi-Einzeldosis-Überlebenskurve aus den Fraktionierungsdaten ermöglicht (14,28,29). Dazu wird der Gesamteffekt gegen die Einzeldosis aufgetragen, die Hälfte des Gesamteffekts gegen die Dosis, deren Verdopplung wiederum den Gesamteffekt bewirkt usw. (13). Nimmt man an, daß jede Fraktion in einem Fraktionierungsschema den gleichen Anteil an einem bestimmten, vollen Strahleneffekt bewirkt, läßt die graphische Auftragung der gewonnenen Daten für die einzelnen Fraktionen die Schulter der zugrunde liegenden Dosis-effektkurve erkennen.

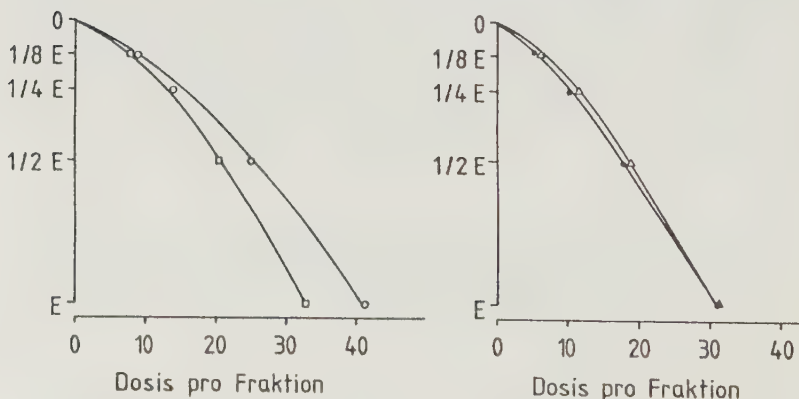


Abb.14: Quasi-Einzeldosis-Überlebenskurve, wobei als Isoeffekt eine Wachstumsverzögerung von 40 Tagen zugrunde liegt:
a) Passage 5 (o) und Passage 7 (□) des H.P.-Melanom,
b) Passage 5 (Δ) und Passage 11 (●) des B-16 Melanom.

In Abbildung 14 und 15 wurden aus den in den Fraktionierungsexperimenten gewonnenen Daten Quasi-Einzeldosis-Überlebenskurven für Passagen 5 und 7 des H.P.-Melanoms und Passage 5 und 11 des B-16 Melanoms erstellt, wobei Abb.14 als Isoeffekt eine Wachstumsverzögerung von 40 Tagen und Abb.15 die TCD 50 zugrunde liegt. Es ergeben sich Kurven, die nach anfänglicher Krümmung relativ gerade auslaufen. Die Neigungen der Tangenten nehmen im Verhältnis des Anfangs- zum Endteil der Kurven um den Faktor 3-5 zu.

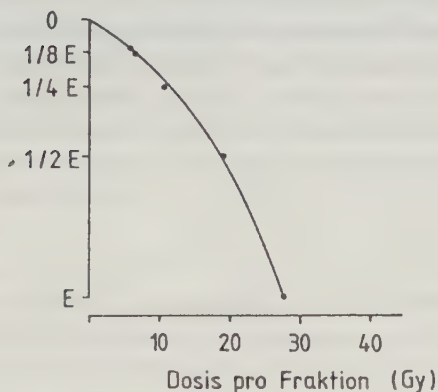


Abb.15: Quasi-Einzeldosis-Überlebenskurve für das Melanom B-16. Als Isoeffekt liegt die TCD 50 zugrunde.

4.6. Linear-quadratisches Modell der Dosiswirkungskurve

Neuere Untersuchungen über das Fraktionierungsverhalten unterschiedlicher Gewebe in situ legen nahe, daß die zugrundeliegende Dosiseffektkurve in der Tat eine stetig gekrümmte Kurve und nicht die klassische Schulterkurve mit exponentiellem Endteil ist. Ein Maß für Reparaturvorgänge, das nicht abhängig ist von der Größe des der Be-

rechnung zugrundeliegenden Isoeffektlevels, bietet das linear-quadratische Modell der Dosiswirkungskurve (1,9,10,16,18,51). Es wird mathematisch wie folgt beschrieben:

$$Sf = e^{- (a \cdot D + \beta \cdot D^2)} \quad (1)$$

Sf (survival fraction) entspricht dem überlebenden Anteil der Zellen und D der applizierten Dosis. Der Anteil der direkt letalen Treffer am Gesamteffekt wird durch den linearen Term ($a \cdot D$), der Anteil erst durch Interaktion letal wirkenden Treffer als quadratischer Term ($\beta \cdot D^2$) ausgedrückt. Für fraktionierte Bestrahlung kann weiterführend angenommen werden, daß zum Zustandekommen eines Gewebseffekts jede einzelne von n gleich großen Fraktionen den gleichen Teileffekt leistet; wenn d der Dosis pro Fraktion und n der Anzahl der Fraktionen entspricht, gilt somit die Beziehung:

$$Sf = n \cdot (a \cdot d + \beta \cdot d^2) \quad (2)$$

In situ ist Sf nicht eruierbar, aber für einen konstanten Gewebseffekt ist Sf konstant. Daher geht anstelle Sf der Gewebseffekt E in die Gleichung ein. Werden beide Seiten dieser Gleichung (2) durch E und die Gesamtdosis D ($D = n \cdot d$) geteilt, so ergibt sich die Gleichung:

$$1/D = a/E + (\beta/E) \cdot d \quad (3)$$

Trägt man die reziproke Gesamtdosis gegen die Dosis pro Fraktion für einen Isoeffekt graphisch auf, so wird die Gleichung (3) durch eine Gerade wiedergegeben. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate ist a/E , die Steigung β/E . Die Größe E entspricht im zellulären Modell dem negativen natürlichen Logarithmus der Überlebensrate. Er bleibt bei der Untersuchung in situ unbekannt, so daß auch die Absolutwerte der Parameter a und β nicht bestimmt sind. Ableitbar jedoch ist der Wert a/β , der das Fraktionierungsverhalten umfassend beschreibt. Der Wert a/β gibt diejenige Dosis an, bei der der Effektbeitrag aus dem linearen (direkt letalen) und dem quadratischen (interaktiv letalen) Glied gleich groß

der Dosiseffektkurve, die mit steigendem a/B stärker gestreckt, mit abnehmendem a/B "kurviger" wird (10,39,51). Aus der Gestalt der Kurve ist aber bereits der Fraktionierungseffekt abzuleiten.

Der a/B -Wert ist insbesondere geeignet, den Fraktionierungseinfluß, d.h. den Einfluß der Dosis pro Fraktion zu bewerten (62). Je kleiner a/B ist, desto stärker ist der Fraktionierungseffekt von der Dosis pro Fraktion abhängig. Bei hohen a/B Werten ist der a -Term und damit die direkt letale Komponente vorherrschend. Bei $0.1a/B$ pro Fraktion tritt eine "Sättigung" des Fraktionierungseffektes ein. Eine weitere Fraktionierung hat praktisch keinen Einfluß mehr auf die gesamte Isoeffektdosis. Diese Dosis wird als "flexure dose" bezeichnet (15,64).

Untersuchungen aus den letzten 10 Jahren ergaben grundsätzliche Unterschiede zwischen spät und früh reagierenden Normalgeweben. So lag die "flexure dose" für spät

Tumor	Methode	Fraktionen	a/B (Gy)
Mam.Ca.N.T.	G.D.	1,3,6,9	7,3
Mam.Ca.A.T.17	G.D.	1,2,4,6	10,8
C3H Mam.Ca.	TCD 50	1,2,10	15,3
C3H Mam.Ca.	TCD 50	1,2,5,10,20	18,8
Slow sarcoma S	G.D.	1,2,5	19,3
Mam.Ca.N.T.	G.D.	1,2,5	9,1
Mam.Ca.N.T.	G.D.	1,3,6,9	15,5
DBA Mam.Ca.	TCD 50	1,10	9,0
C3H Mam.Ca.	TCD 50	1,10	9,9
Squamous Ca.	TCD 50	1,10	12,1
Fibrosarcoma	TCD 50	1,10	0,9

Tab.3: a/B -Werte für Tumoren, die in situ unter anoxischen Bedingungen untersucht wurden (62). Die Werte sind mit einem Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) von 2,7 korrigiert.

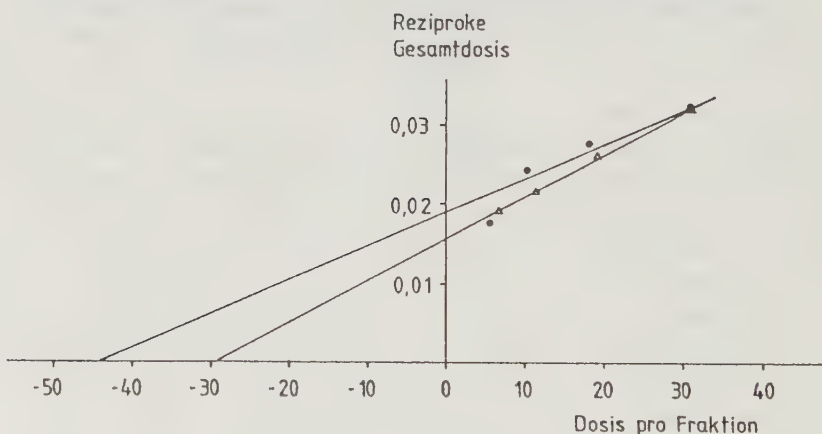
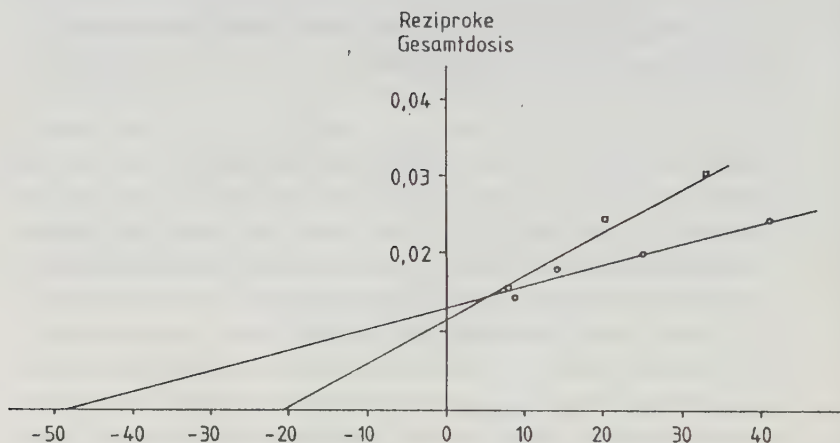


Abb.16: Darstellung der reziproken Gesamtdosis als Funktion der Dosis pro Fraktion:
a) Passage 5 (o) und Passage 7 (■) des H.P.-Melanoms (Isoeffekt Wachstumsverzögerung von 40 Tagen),
b) Passage 5 (Δ) und Passage 11 (●) des Melanoms B-16 (Isoeffekt Wachstumsverzögerung von 40 Tagen).

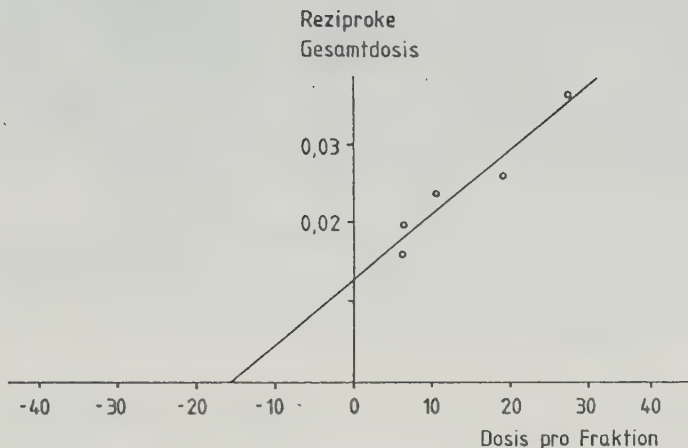


Abb.16c): Darstellung der reziproken Gesamtdosis als Funktion der Dosis pro Fraktion für das Melanom B-16, wobei als Isoeffekt die TCD 50 zugrunde liegt.

reagierende Gewebe zwischen 0.15 und 0.5 Gy, für früh reagierende zwischen 0.6 und 1.4 Gy (15,62).

Eine Zusammenstellung aller in der Literatur verfügbaren Daten über die Erholungsfähigkeit von Experimentaltumoren ist kürzlich von Williams et al. gegeben worden (62). Für die Tabelle 3 sind ihr alle Werte von Tumoren entnommen, die in situ mit verschiedenen Fraktionierungsschemata in anoxischem Zustand bestrahlt und deren α/β unter Zugrundelegung ihrer Wachstumsverzögerung (G.D.) oder der lokalen Heilungsrate (TCD 50) ermittelt wurde.

Abbildung 16, gibt die Auftragung der reziproken Gesamtdosis gegen die Dosis pro Fraktion für je 2 Passagen des H.P.-Melanoms und das B-16 Melanom wieder. Abb.16 a und b liegt als Isoeffekt eine Wachstumsverzögerung von 40 Ta-

gen zugrunde, Abb.c die TCD 50 der lokalen Tumorheilung. Diese graphische Darstellung von Isoeffektdosen, des sogenannten Fe-Plots, wird im strahlenbiologischen Schrifttum weitgehend verwendet, obwohl nicht alle Grundvoraussetzungen aus statistischer Sicht erfüllt sind. So sind die Variablen nicht unabhängig voneinander (57).

Statistisch korrekt ist die Berechnung von a/B mittels einer nicht linearen Regression, die mit dem SAS-Programm gerechnet werden kann (47,57). Es wurden damit folgende Werte berechnet:

Tumor	a/B	95%iger Vertrauensbereich
H.P. Melanom		
Passage 5	49 Gy	15 - 83 Gy
Passage 7	21 Gy	0 - 97 Gy
Melanom B-16		
Passage 5	30 Gy	21 - 38 Gy
Passage 11	45 Gy	0 - 105 Gy
Melanom B-16 (Isoeffekt TCD 50)	15 Gy	0 - 30 Gy

Tab.4: a/B-Werte für das H.P. und B-16 Melanom für hypoxische Bestrahlungsbedingungen.

Um diese Daten mit denen von Normalgeweben zu vergleichen, die grundsätzlich unter Euoxie bestimmt werden, sind sie nachfolgend mit einem - konventionell angenommenen - Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) von 2,7 dividiert. Es ergeben sich damit folgende Werte:

Tumor	Methode	Fraktionen	a/B
H.P.-Melanom			
Passage 5	G.D.	1,2,4,8	18 Gy
Passage 7	G.D.	1,2,8	8 Gy
Melanom B-16	TCD 50	1,2,4,8,10	6 Gy
Melanom B-16			
Passage 5	G.D.	1,2,4,8	11 Gy
Passage 11	G.D.	1,2,4,10	17 Gy

Tab.5: a/B-Werte für die untersuchten Melanome B-16 und H.P.. Die Werte sind durch einen Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) von 2.7 dividiert.

Der Vergleich der a/B-Werte aus Tabelle 3 und 5 zeigt, daß die für das B-16 und H.P.-Melanom ermittelten Werte im Rahmen der für andere Tumoren gefundenen Werte liegt. Der Tumor ist vergleichbar früh reagierenden Normalgeweben, deren a/B im Bereich von 6-14 Gy liegt.

Die daraus abgeleiteten Werte der "flexure dose" ($0.1a/B$) liegen nahe bei der klinisch üblicherweise applizierten Dosis von 2 Gy. Hyperfraktionierung verspricht eine Schonung der Normalgewebe, mehr von spät reagierendem als von früh reagierendem. Da das maligne Melanom wie alle anderen untersuchten Tumore in der Reaktion auf Bestrahlung früh reagierendem Normalgewebe vergleichbar sind, läßt bei deren Behandlung Hyperfraktionierung einen therapeutischen Gewinn im Vergleich zu den spät einsetzenden Reaktionen des Normalgewebes erwarten (39,51).

4.7 Isoeffektkurven nach Strandqvist

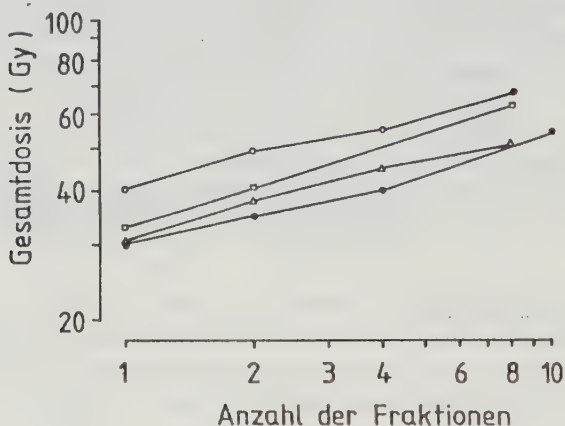


Abb.17: Isoeffektkurven der Gesamtdosis als Funktion der Anzahl der Fraktionen für Passage 5 (o) und Passage 7 (□) des H.P.-Melanom, sowie Passage 5 (Δ) und 11 (•) des Melanom B-16.

In Abbildung 17 wurde die Gesamtdosis als Funktion der Anzahl der Fraktionen für Passage 5 und 7 des H.P.-Melanoms und Passage 5 und 11 des B-16 Melanoms in doppellogarithmischem Maßstab aufgetragen. Als Isoeffekt liegt dabei eine Wachstumsverzögerung von 40 Tagen zugrunde. Diese Darstellung des Fraktionierungseffekts geht letztlich auf Strandqvist zurück (19,50). Strandqvist trug Isoeffekte der Haut (z.B. Rötung, Schuppung- oder Nekrose) als Funktion der Gesamtbehandlungszeit auf. Da die Gesamtdosis in Form von 5 Fraktionen pro Woche gegeben wurden und somit eine längere Behandlungszeit eine größere Zahl von Fraktionen bedeutete, beinhaltet die Gesamtbehandlungszeit einen Faktor, der von der Anzahl der Fraktionen abhängig ist. Fowler und Stern legten dar, daß, um einen bestimmten Effekt zu erreichen, die Zahl der Fraktionen

der dominierende Faktor ist (16). Sie führten das Konzept ein, die Gesamtdosis als Funktion der Anzahl der Fraktionen darzustellen.

	Steigung	Ref.
H.P-Melanom		
Passage 5	0.18	
Passage 7	0.3	
B-16 Melanom		
Passage 5	0.23	
Passage 11	0.22	
Haut	0.24	(25)
ZNS	0.38	(25)

Tab.5: Steigungswerte der Isoeffektkurven nach Strandqvist.

In Tabelle 5 sind die Steigungswerte der Isoeffektkurven nach Strandqvist für die Passagen 5 und 7 des H.P.-Melanom und Passagen 5 und 11 des Melanom B-16 aufgeführt. Zum Vergleich wurden Werte aus der Literatur für ein akut und ein spät reagierendes Normalgewebe hinzugefügt. Das Melanom ist in seinem Verhalten akut reagierendem Gewebe vergleichbar.

Abbildung 18 stellt Isoeffektkurven der Gesamtdosen als Funktion der Dosen pro Fraktion für akut und spät reagierende Normalgewebe dar. Die Kurven beruhen auf Daten aus der Literatur, die von Thames et al. zusammengestellt und veröffentlicht wurden (51). Die Kurven, die Isoeffekte von spät reagierenden Geweben beschreiben, verlaufen steiler als die von akut reagierenden Geweben. Der Verlauf der Kurven in Abbildung 18 ist im Prinzip vergleichbar mit dem aus Abbildung 17, da bei gleicher Gesamtdosis ein Anwachsen der Anzahl von Fraktionen zugleich eine Abnahme der Dosis pro Fraktion bedeutet. Ein Vergleich der Kurven aus Abbildung 17 mit denen aus Abbildung 18

ergibt, daß die Neigung der Kurven für die Melanome B-16 und H.P. denen für akut reagierende Normalgewebe ähnlich ist. Dies steht in Einklang mit den Schlüssen, die in 4.6 aus dem Vergleich der entsprechenden α/β -Werte gezogen werden konnten.

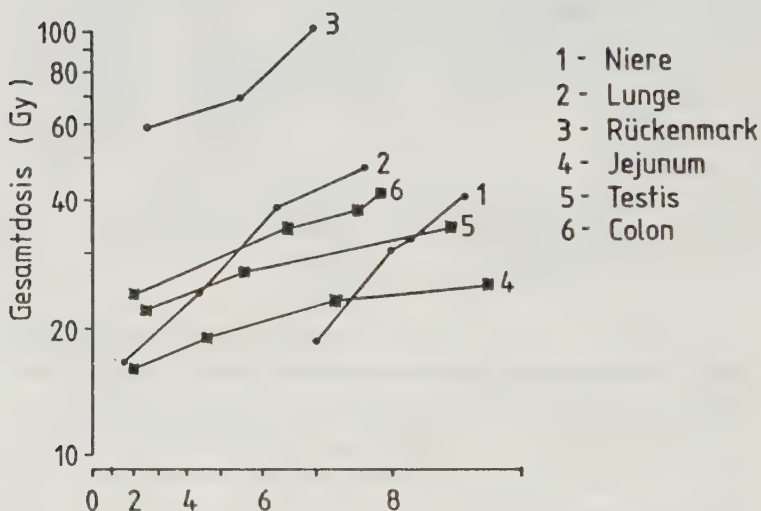


Abb.18: Isoeffektkurven der Gesamtdosis als Funktion der Dosis pro Fraktion für akut und spät reagierende Normalgewebe (51).

4.8 Sichtung von experimentellen Ergebnissen verschiedener Melanome aus in vitro und in situ Assays

In der Literatur sind verschiedene Daten aus Experimenten mit Melanomen veröffentlicht. In vitro Experimente mit Exzisions-Assays ergaben für das Harding-Passey Melanom zelluläre Überlebenskurven, die sich durch eine breite Schulterbildung auszeichnen (8). Dies gilt ebenso für das

Hamstermelanom A mel 3 (55). Diese Schulterbildung wurde für die relative Strahlenresistenz des Melanoms verantwortlich gemacht, wenn in vivo die Dosis in kleinen Fraktionen eingestrahlt wurde (24). Daß Melanome allerdings eine sehr heterogene Tumorgruppe sind, zeigen Veröffentlichungen über in vitro Experimente von menschlichen Melanomzellen. Zwar zeigen die meisten Zelllinien ebenfalls breitschultrige Überlebenskurven, aber es werden auch Überlebenskurven mit einer nur mäßig ausgeprägten Schulterbildung gefunden (2,17,27,34,53,55,61,65). So untersuchten Rofstad et al. 14 Melanomzelllinien, die sich unmittelbar von menschlichen Operationspräparaten ableiteten (44). Die daraus gewonnenen Überlebenskurven zeigten ebenfalls individuelle Verläufe mit meist ausgeprägter, aber auch mäßiger Schulterbildung. Die α/β -Werte lagen zwischen 0,5 und 62,5 Gy mit der Einschränkung, daß die Daten mit großen Standardfehlern behaftet sind. Frühere Untersuchungen des Harding-Passey Melanoms, die auf eine hohe Strahlenresistenz des Tumors hinwiesen, sind mit erheblichen methodischen Einschränkungen behaftet. So lag als Kriterium zur Beurteilung der Strahlenwirkung die Angehrate von bestrahlten Tumorzellen in der Gewebeskultur zugrunde (45). Spätere in situ Untersuchungen ergaben im Vergleich mit anderen Tiertumoren keinen Hinweis auf eine erhöhte Strahlenresistenz (23,31). Die Dosiseffektkurve des B-16 Mäusemelanoms zeigte nach Bestrahlung mit Einzeitdosen keine Neigung zu ausgeprägter Schulterbildung (23). Eine generelle Neigung zur ausgeprägten Schulterbildung ist dem experimentellen malignen Melanom nicht eigen, aufgrund einer breiten Schulterbildung in in vitro Experimenten kann nicht auf eine erhöhte Strahlenresistenz in vivo geschlossen werden (22).

4.9 Klinik

In der Vergangenheit der Strahlentherapie wurden maligne Melanome als strahlenresistente Tumoren betrachtet.

Bereits 1926 beschrieb Miescher bei menschlichen Melanomen eine geringe Reaktion auf Röntgenbestrahlung (35).

Im Laufe der Zeit bestärkten experimentelle Ergebnisse und klinische Erfahrungen den Eindruck, daß es sich zumindest im Vergleich zu anderen Hauttumoren um einen strahlenresistenten Tumor handelt (4,38,61). Daher spielte die Strahlentherapie des primären oder metastasierenden Melanoms in vielen Ländern eine nur bescheidene Rolle in der Behandlung dieser Erkrankung (54).

Inzwischen ist die Annahme einer besonderen Strahlenresistenz des Melanoms aufgegeben (2,49). Allerdings wird postuliert, daß nur große Dosen pro Fraktion einen entsprechenden Erfolg in der fraktionierten Radiotherapie des malignen Melanoms erwarten lassen (36,37). Overgaard folgert dies in seinen Untersuchungen aus der Feststellung, daß eine erfolgreiche Therapie am besten mit der Gabe von hohen Dosen pro Fraktion von ≥ 6 Gy korrelierte, weniger gut dagegen mit radiobiologischen Parametern wie Gesamtdosis, Behandlungszeit oder verschiedenen Variationen des NSD-Konzepts (47). Er berechnete ein a/B von 2.5 Gy aus seinen klinischen Beobachtungen. Andere Untersucher beobachteten die beste Tumorregression nach Bestrahlung ebenfalls nach der Gabe von hohen Dosen pro Fraktion. Als Grund dafür wurde eine ausgeprägte Schulter, bzw. Elkind-Erholung der Dosis-Effekt-Kurve der Melanomzellen angenommen (24).

Andere Untersucher widersprechen. Trott et al. führten diese Beobachtung darauf zurück, daß den Analysen das Verhalten der Tumorregression zugrunde lag (56). Seine Daten basieren auf der Analyse der lokalen Rezidivfreiheit. Er fand, daß die Effektivität der fraktionierten Radiotherapie bezüglich der lokalen Tumorkontrolle mehr von der Gesamtbehandlungszeit als von der Zahl und Höhe der Dosis der Fraktionen abhängig ist.

Die häufig in vitro gefundene, ausgeprägte Schulterbildung der Überlebenskurve ist in situ bei den beiden hier untersuchten Mäusemelanomen nicht nachzuvollziehen. Das Verhalten des malignen Melanoms auf fraktionierte Bestrahlung unterscheidet sich nicht von dem anderer transplantabler Tumoren. Eine Erhöhung der Dosis pro Fraktion bei der fraktionierten Strahlentherapie, die zugleich auch eine Erhöhung der Gefahr von späten Strahlenschäden an Normalgeweben beinhaltet, wäre nur dann zur Erhöhung der effektiven biologischen Tumordosis zu rechtfertigen, wenn die in situ gewonnenen Überlebenskurven sehr kurvig verlaufen und ein $\alpha/\beta \ll 5$ Gy aufweisen würden, wie es von Overgaard postuliert wurde (36,37). Dies ist nicht der Fall. Von Rottaky weist darauf hin, daß mit akzelerierter Bestrahlung bei Fraktionsdosen um und unter 2 Gy hervorragende Ergebnisse zu erzielen sind (60).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Als murine Melanommodelle wurden das Harding-Passey Melanom und das Melanom B-16 in Hinblick auf das Verhalten nach fraktionierter Bestrahlung untersucht. Das H.P.-Melanom wurde auf männliche Albinomäuse vom Stamm NMRI, das B-16 Melanom auf weibliche C57 Bl/6J Mäuse transplantiert. Nach Erreichen der Behandlungsgröße von 80-120 mg wurden die Tumoren bestrahlt, nachdem sie durch Abklemmen der Blutzufuhr in einen einheitlichen anoxischen Zustand versetzt worden waren. Die Strahlendosen wurden als Einzeitdosen, 2, 4, 8 oder 10 Fraktionen verabreicht. Nach Bestrahlung wurden die Tumoren regelmäßig bis zu einer Rezidivgröße von 1000 mg gemessen, bzw. bis zu 6 Monaten nach Bestrahlung beobachtet. Für jede Versuchsgruppe wurden aus den individuellen Wachstumskurven gemittelte Wachstumskurven erstellt und anschließend die Wachstumsverzögerung bis zum Erreichen einer Rezidivgröße von 400 mg dargestellt. Für das Melanom B-16 wurde außerdem die mittlere lokale Heilungsdosis (TCD 50) errechnet.

Die erhaltenen Werte wurden anhand verschiedener etablierter Verfahren (erholte Dosis pro Fraktion, linear-quadratisches Modell und Isoeffektkurven nach Strandqvist) analysiert und mit veröffentlichten Werten aus der Literatur verglichen. Es ergab sich, daß beide Melanome in situ nur eine mäßige Schulter der Überlebenskurven zeigten. Sie unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegenüber fraktionierter Bestrahlung somit nicht stark von anderen transplantablen Tumorsystemen. Eine besondere Strahlenresistenz oder Fähigkeit zur Erholung vom subletalen Strahlenschaden war nicht festzustellen. Das linear-quadratische Modell ergab nach Umrechnung auf eukoxische Verhältnisse α/β -Werte von 8 bis 18 Gy für das Harding-Passey Melanom, 6 bis 17 Gy für das B-16 Melanom. Die Melanome gleichen in ihrem Fraktionierungsverhalten

somit akut reagierenden Normalgeweben. Die Ergebnisse stützen nicht die Theorie, daß Melanome besser mit wenigen hohen Dosen pro Fraktion als konventionell zu bestrahlen seien.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARENDSEN, PH.D.: Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, (1982), 1981-1997.
2. BARRANCO, S.C., M.M. ROMSDAHL, R.M. HUMPHREY: The radiation response of human malignant melanoma cells grown in vitro. *Cancer Res.* 31, (1971), 830-833.
3. BEGG, A.C.: Analysis of growth delay data: potential pitfalls. *Br. J. Cancer* 41, Suppl. IV, (1980), 93-97.
4. CARLING, E.R., B.W. WINDEYER, D.W. SMITHERS: *British Practice in Radiotherapy*. Butterworths, London, (1975).
5. CHOI, KWANG N., H.R. WITHERS, M. ROTMAN: Intracranial metastases from melanoma. Clinical features and treatment by accelerated fractionation. *Cancer* 56, (1985), 1-9.
6. DENEKAMP, J.: Experimental tumor systems: standardization of endpoints. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, (1979), 1175-1184.
7. DENEKAMP, J., F.A. STEWART: Evidence for repair capacity in mouse tumors relative to skin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, (1979), 2003-2010.
8. DEWEY, D.L.: The radiosensitivity of melanoma cells in culture. *Brit. J. Radiol.* 44, (1971), 816-817.
9. DOUGLAS, B.G.: Superfractionation: its rationale and anticipated benefits. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, (1982), 1143-1153.

10. DOUGLAS, B.G., J.F. FOWLER: The effect of multiple small doses of X-rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. Radiat. Res. 66, (1976), 401-426.
11. FERTIL, B., E.P. MALAISE: Inherent cellular radio-sensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7, (1981), 621-629.
12. FLETCHER, G.H.: Clinical parameters. In: Fletcher, G.H.: Textbook of radiotherapy. Lea & Febiger, Philadelphia, (1973), 121-151.
13. FOWLER, J.F.: Review: Total doses in fractionated radiotherapy - implications of new radiobiological data. Int. J. Radiat. Biol. 46, (1984), 103-120.
14. FOWLER, J.F., J. DENEKAMP, C. DELAPEYRE, S.R. HARRIS, P.W. SHELDON: Skin reactions in mice after multifraction X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 25, (1974), 213-223.
15. FOWLER, J.F., M.C. JOINER, M.V. WILLIAMS: Low doses per fraction in radiotherapy: a definition for "flexure dose" (letter). Br. J. Radiol. 56, (1983), 599-601.
16. FOWLER, J.F., B.E. STERN: Dose-time relationships in radiotherapy and the validity of cell survival curve models. Br. J. Radiol. 36, (1963), 163-173.
17. GUICHARD, M., C. GOSSE, E.P. MALAISE: Survival curve of a human melanoma in nude mice. J. Nat. Cancer Inst. 58, (1977), 1665-1669.
18. HABERMALZ, H.J.: Irradiation of malignant melanoma: experience in the past and present. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7, (1981), 131-133.

19. HALL, E.J.: Radiobiology for the Radiologist. 2 nd Ed.: Harper & Row,; New York, (1978).
20. HARDING, H.E., R.D. PASSEY: A transplantable melanoma of the mouse. J. Bact. Path. 33, (1930), 417-427.
21. HEWITT, H.B., E.R. BLAKE: The growth of transplanted murine tumours in pre-irradiated sites. Brit. J. Cancer, 22, (1968), 808-824.
22. HILL, H.Z., G.J. HILL, C.F. MILLER, , F. KWONG, J. PURDY: Radiation and Melanoma: Response of B-16 Mouse Tumor Cells and Clonal Lines to in vitro Irradiation. Radiat. Res. 80, (1979), 259-276 .
23. HILL, R.P., J.A. STANLEY: The lung-colonyassay: Extension to the Lewis lung tumor and the B-16 melanoma - Radiosensitivity of B-16 melanoma cells. Int. J. Radiat. Biol. 27, (1975), 377-387.
24. HORNSEY, S.: The radiosensitivity of melanoma cells in culture. Br. J. Radiol. 45, (1972), 158.
25. HORNSEY, S.: Isoeffekt relationships for normal tissue damage. High and low linear energy transfer radiations. In: The biological basis of radiotherapy (Editors: G.G. Steel, G.E. Adams, M.J. Peckham). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1983). 167-179.
26. HUG, O., K.R. TROTT: Biologische Grundlagen der Strahlenwirkung. In: Radiologie 1, 2. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart, (1979), 34-64.
27. INADA, T., T. KASUGA, I. NOJIRI, T. HIRAOKA, T. FURUSE: Comparative study on radiosensitivities of cultured cell lines derived from several human tumors under hypoxic condition. Gann 68, (1977), 357-362.

28. JOINER, M.C., J.C. BREMNER, J. DENEKAMP, R.L. MAUGHAN:
The interaction between X-rays and 3 MeV neutrons in
the skin of the mouse foot. Int. J. Radiat. Biol.
46, (1984), 625-638.
29. JOINER, M.C., R.L. MAUGHAN, J.F. FOWLER, J. DENEKAMP: The
RBE for mouse skin irradiated with 3-MeV neutrons:
single and fractionated doses. Radiat. Res. 95,
(1983), 130-141.
30. KOKOSCHKA, E.-M.: Malignes Melanom - Therapie. In:
Dermatologische Onkologie (Herausgeber A. Luger u.
F. Gschnait). Urban und Schwarzenberg. Wien,
München, Baltimore. (1983), 178-186.
31. KUMMERMEHR, J.C.: Kurabilität des Harding-Passey-Melanoms
durch Einzeitbestrahlung. Strahlentherapie 154,
(1978), 578-581.
32. LIEVEN, H.v., D. SKOPAL: Zur Strahlenempfindlichkeit des
malignen Melanoms. Strahlentherapie 152, (1976),
1-4.
33. MACHER, E., B.M. CZARNETZKI, F. VAKILZADEH: Malignes
Melanom - Klinik. In: Dermatologische Onkologie
(Herausgeber A. Luger u. F. Gschnait). Urban und
Schwarzenberg. Wien, München, Baltimore. (1983),
145-177.
34. MALAISE, E.P., J. WEININGER, A.M. JOLY, M. GUICHARD:
Measurements in vitro with three cell lines derived
from melanomas. In: Cell survival after low doses of
radiation. (Editor: T. Alper). Wiley & Sons,
Bristol, (1975), 223-225.
35. MIESCHER, G.: Zur Frage der Strahlenresistenz der
Melanome. Schweiz. med. Wschr., (1926), 788-812.

36. OVERGAARD, J.: The role of radiotherapy in recurrent and metastatic malignant melanoma: a clinical radiobiological study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12, (1986), 867-872.
37. OVERGAARD, J., M. OVERGAARD, P.V. HANSEN, H. von der MAASE: Some factors of importance in the radiation treatment of malignant melanoma. *Radiother. and Oncol.* 5, (1986), 183-192.
38. PATERSON, R.: The treatment of malignant disease by radium and X-rays. Arnold, London, (1948).
39. PETERS, L.J., H.R. WITHERS, H.D. THAMES: Radiobiological basis for multiple daily fractionation. In: "Progress in Radio-Oncology II". (Eds. K.H. Kärcher et al.). Raven Press, New York, (1982), 317-323.
40. PORTER, E.H.: The statistics of dose-cure relationships for irradiated tumours. *Br. J. Radiol.* 53, (1980), 210-217.
41. PREUSS-BAYER, G.: Jahresbericht 1980, Gruppe Experimentelle Tumorthherapie. GSF-Bericht B 1253, (1981), 34-36.
42. REGAUD, C., R. FERROUX: Über den Einfluß des Zeitfaktors auf die Sterilisation des normalen und des neoplastischen Zellwachstums durch Radiotherapie. *Strahlentherapie* 31, (1929), 495-508.
43. REIFFERSCHIED, M., J. STARKE: Haut und Unterhaut. In: Reifferscheid, M.: *Chirurgie*: 6. Auflage, Thieme. Stuttgart, New York. (1983), 235-239.
44. ROFSTAD, E.K., A. WAHL, K.M. TVEIT, O.R. MONGE, T. BRUSTAD: Survival curves after X-ray and heat treatments for melanoma cells derived directly from surgical specimens of tumours in man. *Radiother. and Oncol.* 4, (1985), 33-44.

45. ROHDE, B., A. WISKEMANN: Über das Wachstum röntgenbe-
strahlter Melanomalignome in der Gewebekultur und im
Transplantationsversuch. I. Versuche am
Melanomalignom des Menschen und am Tiermelanom nach
Einzeitbestrahlung. Strahlentherapie 123, (1964),
534-544.
46. RUBIN, P., B. KELLER, R. QUICK: The range of prescribed
tumor lethal doses (PTLD) in the treatment of
different human tumors. In: The biological and
clinical basis of radiosensitivity. (Editor: M.
Friedman, C.C. Thomas). Springfield, Illinois.
(1974), 435-484.
47. SAS Institute Inc. SAS User's Guide: Statistics, 1982
Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1982.
48. SOBER, A.J., T.B. FITZPATRICK: Melanoma fact sheet.
Ca-A Cancer Journal for Clinicians 29, (1976), 276.
49. STORCK, H.: Zur Therapie der Melanomalignome an Hand von
141 nachkontrollierten determinierten Melanomen
(Stadium I). Schweiz. med. Wschr. 98, (1968),
1552-1561.
50. STRANDQVIST, M.: Studien über die kumulative Wirkung der
Röntgenstrahlen bei Fractionierung. Acta Radiol.
(Stockholm). Suppl. 55, (1944), 1-300.
51. THAMES, H.D., H.R. WITHERS, L.J. PETERS, G.H. FLETCHER:
Changes in early and late radiation responses with
altered dose fractionation: implications for
dose-survival relationships. Int. J. Radiat. Oncol.
Biol. Phys. 8, (1982), 219-226.
52. THOMLINSON, R.H., CRADDOCK, E.A.: The gross response of
an experimental tumour to single doses of X-rays.
Brit. J. Cancer 12, (1967), 108-123.

53. THOMSON, L.F., A.R. SMITH, R.M. HUMPHREY: The response of a human malignant melanoma cell line to high LET radiation. *Radiology* 117, (1975), 155-158.
54. TROTT, K.R.: Experimental results and clinical implications of the four R's in fractionated radiotherapy. *Radiat. Environm. Biophys.* 20, (1982), 159-170.
55. TROTT, K.R., H. v. LIEVEN, J. KUMMERMEHR, D. SKOPAL, S. LUKACS, O. BRAUN-FALCO: The radiosensitivity of malignant melanomas : experimental studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7, (1981), 9-13.
56. TROTT, K.R., H. v. LIEVEN, J. KUMMERMEHR, D. SKOPAL, S. LUKACS, O. BRAUN-FALCO, A.M. KELLERER: The radiosensitivity of malignant melanomas: clinical studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7, (1981), 15-20.
57. TUCKER, S.L.: Tests for the fit of the linear-quadratic model to radiation isoeffect data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10. (1984), 1933-1939.
58. UICC: Berechnung von Überlebenskurven. Die Methode von Kaplan-Meier. In: *TNM-Klassifikation von malignen Tumoren*. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1979), 167-169.
59. VOIGT, H.: Epidemiologische Aspekte, Prävention und Aufklärung. In: *Malignes Melanom* (Herausgeber H. Voigt und U.R. Kleeberg). Springer. Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. (1986), 3-22.
60. VON ROTTAKY, P.: Strahlentherapie bei malignem Melanom mit akzelerierter Fraktionierung. Remissionen und vorläufige Ergebnisse lokaler Tumorkontrolle. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 163, (1987), 139-143.

61. WEININGER, J., M. GUICHARD, A.M. JOLY, E.P. MALAISE, B. LACHET: Radiosensitivity and growth parameters in vitro of three human melanoma cell strains. *Int. J. Radiat. Biol.* 34, (1978), 285-290.
62. WILLIAMS, M.V., J. DENEKAMP, J.F. FOWLER: A review of a/B-ratios for experimental tumors: implications for clinical studies of altered fraction. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11, (1985), 87-96.
63. WITHERS, H.R.: The four R's of radiotherapy. In: *Advances in radiation biology* 5 (Editors: J.T. Lett, H. Adler). Academic Press, New York. (1975). 241-271.
64. WITHERS, H.R.: Response of tissues to multiple small dose fractions. *Radiat. Res.* 71, (1977), 24-33.
65. ZEITZ, L., S. SILAGI: Radiosensitivity of melanoma cells in culture: implications for radiotherapy of malignant melanoms. *Br. J. Radiol.* 50, (1977), 604-606.

L e b e n s l a u f

Name: Georg H a i d e r

Geburtsdatum: 21. 04. 1957

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsort: Wang bei Wasserburg a. Inn, Kreis Mühldorf

Eltern: Benedikt Haider, Schuhmachermeister, und
Marianne Haider, geb. Binstainer, Hausfrau

Familienstand: seit Mai 1987 verheiratet mit Gabriele
Haider, geb. Ruf, Diplom-Kaufmann

Schul Ausbildung: 1963 - 1968 Volksschule Wang
1968 - 1971 Gymnasium Gars
1971 - 1974 Reuchlin-Gymnasium Ingolstadt
1974 - 1977 Ignaz-Günther-Gymnasium,
Rosenheim

Ersatzdienst: 1977 - 1978 Urologische Abteilung des KKH
Dorfen

Berufsausbildung: 1978 - 1980 Rechtspflegeranwärter am
Amtsgericht München

Studium: 1980 - 1986 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München
Nov. 1986 Studienabschluß mit dem
III. Staatsexamen

Berufstätigkeit: 16. Februar bis 15. August 1987 Stations-
arzt auf der Inneren Abteilung des
Krankenhauses Weilheim

